

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt - Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Modulation von Proliferation und Migration boviner
kornealer Endothelzellen in Kultur durch humanes
Kammerwasser, Transforming Growth Factor-Beta 2
und Ascorbinsäure**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt - Universität zu Berlin

von
Ilona Ryseck
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. PD Dr.med. Dr. (F) P. Rieck

2. Prof. Dr. med. H.-J. Thiel

3. Prof. Dr. med. M. Wiederholt

Datum der Promotion: 17.07.2000

Zusammenfassung

Einleitung: Die Wundheilung kornealer Endothelzellen erfolgt hauptsächlich durch Migration benachbarter Zellen. Die Endothelzellen sind *in vivo* ständig in Kontakt mit Kammerwasser (KW). TGF- β 2 und Ascorbinsäure (AS) sind in hoher Konzentration im KW enthalten. Der Einfluß von humanem KW, TGF- β 2 und AS auf Proliferation und Migration boviner kornealer Endothelzellen (BCEC) in Kultur wurde untersucht.

Methoden: Proliferation: BCEC der 1.Passage wurden zu $1,5 \times 10^4$ Zellen/Well ausgesät. Mit frischem Medium und Zusatz von humanem KW (10% und 100%), TGF- β 2 (0,1; 1 und 10 ng/ml) und AS (50, 100 und 200 μ g/ml) wurden die Kulturen für 72 oder 96 h inkubiert und anschließend gezählt. Migration: Konfluente Zellkulturen der 1.Passage wurden verwendet. Mit einem modifizierten Trepan (\varnothing 5,5 mm) wurde eine zentrale, zirkuläre "Wunde" gesetzt. Die Kulturen wurden mit frischem Medium, das humanes KW, TGF- β 2 und AS in den o. g. Konzentrationen enthielt, für 72 oder 96 h inkubiert. Zur Auswertung wurden die in den Wundbereich migrierten Zellen an 5 verschiedenen Stellen, ausgehend vom Wundrand, gezählt.

Ergebnisse: Die Proliferation der BCEC wurde durch humanes KW (unverdünntes KW: nahezu 100%; 10%iges KW: 30%) und Ascorbinsäure (ca. 90% bei AS 200 μ g/ml) gehemmt. TGF- β 2 stimulierte die Proliferation bis zu einem 3fachen Wert der Kontrollen. Die Migration wurde durch humanes KW (unverdünntes KW: nahezu 100%; 10%iges KW: 30%) und TGF- β 2 (ca. 50% bei allen Konzentrationen) gehemmt. AS hatte einen stimulierenden Einfluß (20-50%) auf die Migration.

Schlußfolgerung: Noch ist unklar, welche Substanzen im KW für den proliferationshemmenden Einfluß auf korneale Endothelzellen verantwortlich sind. Sowohl AS als auch TGF- β 2 zeigten einen gegensätzlichen Effekt auf Proliferation und Migration kultivierter BCEC. Die Bedeutung dieser Beobachtungen für die Wundheilung humaner kornealer Endothelzellen *in vivo* ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Abstract

Purpose: Corneal endothelial cells are non-proliferating, wound healing primarily occurs by migration of adjacent cells. Endothelial cells *in vivo* are constantly exposed to aqueous humor (AH). Elevated concentrations of TGF- β 2 and ascorbic acid (AA) are present in aqueous humor. The influence of human AH, TGF- β 2 and AA on proliferation and migration of bovine corneal endothelial cells *in vitro* was investigated.

Methods: Proliferation assays: BCEC at first passage were seeded at 1.5×10^4 cells/well. Fresh medium containing human AH (10% and 100%), TGF- β 2 (0,1; 1 and 10 ng/ml) and AA (50, 100 and 200 μ g/ml) was added to the cells. 72 or 96 hours later the cells were counted. Migration assays: BCEC at first passage were grown to confluency. A central, circular "wound" was made with an especially designed trephine (\varnothing 5.5 mm). The cultures were incubated with fresh medium containing human AH, TGF- β 2 and AA in the same concentrations for 72 or 96 hours. The cells were then counted in five randomly chosen sections from the wound edge.

Results: Proliferation of BCE cells was inhibited by human AH (pure AH: nearly 100%, 10% AH: 30%) and AA (about 90% at 200 μ g/ml). TGF- β 2 stimulated the proliferation up to 3 fold compared to the controls. Migration was inhibited by human AH (pure AH: nearly 100%, 10% AH: 30%) and TGF- β 2 (about 50% at all concentrations). AA had a stimulatory effect (20-50%) on migration.

Conclusion: Presently, it remains unknown which substances in AH are responsible for the inhibiting effect on corneal endothelial proliferation. Both TGF- β 2 and AA showed to have a differential effect on proliferation and migration of cultured BCE cells. The significance of these observations for wound healing of human corneal endothelial cells *in vivo* has to be investigated.

Schlagwörter:

Endothelzellen, Ascorbinsäure, TGF-beta2, Kammerwasser, Zellkultur

Keywords:

Endothelial-cells, Ascorbic-acid, TGF-beta2, aqueous-humor, cell-culture

Inhaltsverzeichnis

<u>1 Einleitung</u>	7
<u>1.1 Die Hornhaut</u>	7
<u>1.1.1 Struktur</u>	7
<u>1.1.2 Funktion</u>	7
<u>1.2 Das Hornhautendothel</u>	8
<u>1.2.1 Struktur und Funktion</u>	8
<u>1.2.2 Wundheilung in vivo</u>	9
<u>1.3 Die Kultivierung von Hornhautendothelzellen</u>	9
<u>1.4 Wundheilung des Hornhautendothels in vitro</u>	10
<u>1.5 Kammerwasser</u>	10
<u>1.5.1 Bildung und Funktion</u>	10
<u>1.5.2 Zusammensetzung</u>	11
<u>1.6 Wachstumsfaktoren (WF)</u>	12
<u>1.6.1 Der Epidermal Growth Factor (EGF)</u>	12
<u>1.6.2 Die Fibroblast Growth Factors (FGF)</u>	13
<u>1.6.3 Die Transformig Growth Factors beta (TGF-β)</u>	14
<u>1.6.3.1 Der Transforming Growth Factor Beta 2 (TGF-β2)</u>	15
<u>1.7 L-Ascorbinsäure (Friedrich 1987, Nobile und Woodhill 1981)</u>	16
<u>1.7.1 Zusammenhang mit Lipoxygenase</u>	19
2 Ziel der experimentellen Arbeit	21
3 Material und Methoden	22
<u>3.1 Material</u>	22
<u>3.1.1 Zellen</u>	22
<u>3.1.2 Laborinventar</u>	22
<u>3.1.2.1 Gefäße</u>	22
<u>3.1.2.2 Instrumente</u>	22
<u>3.1.2.3 Geräte</u>	23
<u>3.1.3 Medium und Lösungen</u>	23
<u>3.1.3.1 Zusammensetzung des Kulturmediums</u>	23
<u>3.1.3.2 Sonstige Lösungen</u>	23
<u>3.2 Methoden</u>	24
<u>3.2.1 Präparation und Anlegen der Primärkultur</u>	24
<u>3.2.2 Passage der Primärkultur</u>	25
<u>3.2.3 Proliferationsassay</u>	26
<u>3.2.4 Wundassay</u>	26
<u>3.2.5 Proliferations - Experimente</u>	28
<u>3.2.5.1 Humanes Kammerwasser</u>	28
<u>3.2.5.2 TGF-β2</u>	29
<u>3.2.5.3 Ascorbinsäure</u>	29
<u>3.2.6 Wundmodell - Experimente</u>	29
<u>3.2.6.1 Humanes Kammerwasser</u>	30
<u>3.2.6.2 TGF-β2</u>	30
<u>3.2.6.3 Ascorbinsäure</u>	30
<u>3.2.7 Toxizitätstests</u>	30
<u>3.2.8 Statistik</u>	31

<u>4 Ergebnisse</u>	32
<u>4.1 Humanes Kammerwasser</u>	32
<u>4.1.1 Proliferationsversuche</u>	32
<u>4.1.2 Wundmodellversuche</u>	33
<u>4.2 Transforming Growth Factor Beta 2 (TGF-β 2)</u>	35
<u>4.2.1 Proliferationsversuche</u>	35
<u>4.2.2 Wundmodellversuche</u>	38
<u>4.2.3 Toxizitätstests</u>	41
<u>4.3 Ascorbinsäure</u>	42
<u>4.3.1 Proliferationsversuche</u>	42
<u>4.3.2 Wundmodellversuche</u>	47
<u>4.3.3 Toxizitätstests</u>	52
<u>4.3.4 Beeinflussung der Wirkung von Ascorbinsäure auf die Proliferation von BCEC durch 12-S-HETE</u>	54
<u>5 Diskussion</u>	55
<u>5.1 Humanes Kammerwasser</u>	55
<u>5.2 Der Transforming Growth Factor Beta 2 (TGF-β2)</u>	56
<u>5.3 Ascorbinsäure</u>	60
<u>6 Zusammenfassung</u>	65
<u>7 Literaturverzeichnis</u>	67
<u>8 Lebenslauf</u>	73
<u>9 ERKLÄRUNG</u>	74
<u>10 Vorabveröffentlichungen</u>	75

1 Einleitung

1.1 Die Hornhaut

1.1.1 Struktur

Die verschiedenen Schichten der Hornhaut haben ihren embryologischen Ursprung im Ektoderm, Mesoderm und Neuroektoderm der Neuralleiste.

Die Vorderseite der Hornhaut bildet ein mehrschichtiges nicht verhornendes Plattenepithel, dessen Basalzellen fest auf der verdickten Bowman - Membran verankert sind. Es schließt sich das Stroma an, welches aus Kollagenfibrillen besteht. Transparent sind sie durch ihre kristalline Gitteranordnung innerhalb der Stromalamellen (Maurice 1957) und ihren niedrigen Wassergehalt (70%). Das Stroma wird vorderkammerwärts durch die Descemet - Membran begrenzt. Auf dieser Membran sitzt das einschichtige Hornhautendothel, die Abgrenzung der Hornhaut vom Kammerwasser.

Die Hornhaut hat beim Erwachsenen einen Durchmesser von 11,5 mm. Ihre Dicke beträgt im Zentrum 0,50 mm, in der Peripherie 0,65 mm.

Die ausgeprägte sensible Innervation der Hornhaut erfolgt durch Nervenfasern des ersten Trigeminusastes (Ramus ophthalmicus).

Da die Hornhaut keine Gefäße besitzt, wird sie hauptsächlich durch das Kammerwasser aber auch durch den Tränenfilm und das Randschlingennetz ernährt.

1.1.2 Funktion

Die Hornhaut ist ein wichtiger Teil des optischen Systems des Auges und ihre Transparenz ist für das Sehen von größter Bedeutung. Sie dient dem Schutz des Augeninneren vor schädigenden Einflüssen. Aufgrund ihrer Transparenz und Brechkraft wird eine scharfe Abbildung auf der Netzhaut ermöglicht. Durch den Übergang in ein anderes Medium (Luft – Tränenfilm – Hornhaut) und die Wölbung der Hornhaut werden die Lichtstrahlen gebrochen. Die Hornhaut besitzt mit 40 - 45 dpt die stärkste Brechkraft des Auges. Jede Unregelmäßigkeit oder eine Hornhauttrübung

beeinträchtigen die Sehfähigkeit erheblich. Hornhauttrübungen sind die häufigste Erblindungsursache (Taylor 1986).

Die Transparenz der Hornhaut wird an der Vorderseite durch den Tränenfilm und an der Hinterseite durch ein intaktes Hornhautendothel aufrechterhalten.

1.2 Das Hornhautendothel

1.2.1 Struktur und Funktion

Das Hornhautendothel besteht aus einer 5 - 6 μm dicken, einlagigen Zellschicht von 300.000 - 500.000 Zellen (bei Geburt), die kammerwärts der Descemetschen Membran aufsitzen. Die Zellen haben eine polygonale, meist hepta - oder hexagonale Form. Sie sind ungleichmäßig über die Hornhaurückfläche verteilt und haben in der Hornhautperipherie eine höhere Zelldichte als im Zentrum (Schimmelpfennig 1982). In den ersten Lebensjahren nimmt die Dichte der Zellen stark ab, da die Hornhaurückfläche noch wächst, die Endothelzellzahl aber gleich bleibt. Die Zelldichte beträgt beim Neugeborenen 3500 - 4000 Zellen / mm^2 , beim Erwachsenen nur noch 1400 - 2500 Zellen / mm^2 . Mit zunehmendem Lebensalter nimmt die Zellzahl des menschlichen Endothels kontinuierlich ab (Waring et al. 1982, Lopez et al. 1989). Dies ist einer mangelnden Proliferationskapazität zuzuschreiben (Capella 1972). Die durchschnittliche Verminderung der Zelldichte beträgt ca. 0,56 % / Jahr (Murphy et al. 1984). Zusätzlich können Hornhautdystrophien, Traumen und intraokulare Chirurgie zu einem Endothelzellverlust führen.

Das Hornhautendothel hat zwei Hauptfunktionen. Es ernährt die Hornhaut durch Diffusion von Kammerwasserbestandteilen und sichert die Transparenz der Hornhaut durch zwei Mechanismen. Zum einen verhindern die Kontakte der Zellen untereinander (Zonulae occludentes) einen Einstrom von Kammerwasser. Sie bilden eine passive Barriere (Waring 1992). Zum anderen bedient sich das Endothel einer ATP - abhängigen, enzymkatalysierten Ionenpumpe, welche durch aktiven Transport von Natrium, Kalium und Hydrogenkarbonat - Ionen einen passiven Austritt von Wasser aus dem Stroma in die Vorderkammer bewirkt (Waring 1982, Kaufmann 1988).

Wenn die Barriere - und Pumpfunktion des Endothels alteriert ist, kommt es durch verstärkten Einstrom von Wasser in das Stroma zu einem Hornhautödem und einer Trübung der Hornhaut (Waring 1992).

1.2.2 Wundheilung in vivo

Die Wundheilung des menschlichen Hornhautendothels erfolgt hauptsächlich durch Migration. Dabei kommt es nach Vergrößerung und Abflachung der Zellen zum Einwandern derselben in die Wunde. Nach abgelaufener Migration kann es durch Einwanderung benachbarter Zellen über einen Defekt zu einer radiären Anordnung der Zellen (Rosettenformation) kommen (Geroski et al. 1989). Die Art der Wundheilung ist auch vom Ausmaß und der Ursache des Zellverlustes abhängig. Geschädigte Endothelzellen werden in die Vorderkammer abgestoßen (Treffers 1982).

Während der Wundheilung des humanen Hornhautendothels wurden mitotische und amitotische Zellteilungen beobachtet (Zagorski et al. 1980, Hartmann et al. 1986). Man nimmt an, daß mit zunehmendem Lebensalter amitotische Zellteilungen mit Zellvergrößerung vorherrschend sind (Faure et al. 1971).

Zwischen den einzelnen Tierspezies bestehen Unterschiede in der Wundheilung. Die Regenerationsfähigkeit des Endothels von Tieren ist mit zunehmendem phylogenetischen Abstand stärker ausgeprägt als die humaner Endothelzellen. So erfolgt beim Menschen die Wundheilung hauptsächlich durch die Migration und Vergrößerung der Zellen, die Proliferationskapazität ist sehr begrenzt. Dahingegen nimmt die Proliferation den wichtigsten Platz im Wundheilungsprozeß des Endothels von Kaninchen, Ratte, Huhn und Rind ein (Geroski et al. 1989).

Welche endogenen und exogenen Faktoren im Wundheilungsprozeß eine Rolle spielen, ist weitestgehend unbekannt.

1.3 Die Kultivierung von Hornhautendothelzellen

Die Geschichte der Zellkultur begann Anfang unseres Jahrhunderts. Matsui gelang 1928 zum ersten Mal die Kultivierung von Hornhautendothelzellen.

Für die Isolierung von Endothelzellen kommen heute hauptsächlich zwei Methoden zur Anwendung. Wir haben uns der Methode bedient, bei der die Zellen mechanisch in Verbindung mit der Descemet - Membran von der Hornhaut gelöst werden. Nach Erreichen einer konfluenten Primärkultur werden die Zellen mit Hilfe von Enzymlösungen (z.B. Trypsin - Lösung) vom Kulturschalenboden gelöst und erneut

ausgesät (Gospodarowicz et al. 1976). Bei der zweiten Methode werden die Zellen mit Enzymlösungen von der Hornhaut abgelöst und kultiviert (Slick et al. 1965).

Für die Kultivierung stehen spezielle Medien zur Verfügung, denen u.a. Antibiotika und anorganische Puffer sowie tierische oder menschliche Seren zugesetzt werden.

Zellkulturen werden in vielen medizinisch - wissenschaftlichen Bereichen zur Analysierung von Strukturen, Funktionen und Verhaltensweisen der Zellen genutzt. Die Induktion und Modulation von Proliferations - und Migrationsvorgängen bei der Wundheilung des Hornhautendothels läßt sich sehr gut an Zellen in Kultur untersuchen.

1.4 Wundheilung des Hornhautendothels in *vitro*

Bei der Untersuchung der Wundheilung des Hornhautendothels in *vitro* bestätigen sich die oben beschriebenen Speziesunterschiede. Der Auswahl der Spezies für die Zellkultur kommt daher große Bedeutung zu.

Der exogene Einfluß, z.B. von sog. Wachstumsfaktoren und anderer exogener Faktoren, läßt sich an Zellkulturen optimal studieren. Bei einer Reihe von Wachstumsfaktoren, z.B. EGF und bFGF, ist ein stimulierender Einfluß auf die Wundheilung bereits gezeigt worden (Gospodarowicz et al. 1977, Rieck et al. 1992, Watanabe et al. 1987).

Viele Faktoren, die physiologisch auf die Endothelzellen einwirken, sind in ihrer Wirkung noch nicht untersucht. So ist nach wie vor unklar, welchen genauen Einfluß TGF- β 2 und L-Ascorbinsäure, beides Faktoren, die in hoher Konzentration im Kammerwasser vorliegen, auf Proliferation und Migration des Hornhautendothels haben.

1.5 Kammerwasser

1.5.1 Bildung und Funktion

Das Kammerwasser wird im Processus ciliaris des Ziliarkörpers, und zwar vom nicht - pigmentierten Epithel, produziert. Es wird durch aktive Zelltätigkeit (Sekretion) und Ultrafiltration gebildet, wobei aktive Ionentransportvorgänge sowie Karboanhydrase eine Rolle spielen. Die Bildungsrate beträgt 2 mm³/min und sein Gesamtvolumen in Vorder -

und Hinterkammer 0,15 - 0,35 ml. Das Kammerwasser fließt aus der Hinterkammer, an Linse und Iris vorbei, in die Vorderkammer. Es verläßt die Vorderkammer über das Trabekelwerk in den Schlemm - Kanal. Über 20 - 30 Abflußkanäle des Schlemm - Kanals, die mit dem intra- und episkleralen Venenplexus verbunden sind, gelangt das Kammerwasser in die Blutbahn. Die treibende Kraft für die Fließrichtung des Kammerwassers bildet das hydrostatische Druckgefälle. Ein kleiner Teil des Kammerwassers gelangt aus der Vorderkammer zur Uvea und verläßt das Auge über die Sklera (Grehn und Leydhecker 1995).

Eine Funktion des Kammerwassers besteht zum einen in der Aufrechterhaltung des gegenüber der Umgebung erhöhten Augeninnendrucks (15 - 22 mmHg) und damit der Formerhaltung des Bulbus. Zum anderen dient es der Ernährung der gefäßlosen Strukturen des Auges, Kornea, Linse und Glaskörper. Das Kammerwasser ist mit einem Brechungsindex von 1,334 an der Gesamtrefraktion des Auges beteiligt.

1.5.2 Zusammensetzung

Das Kammerwasser ist eine wasserklare Flüssigkeit. Es beinhaltet wenig Proteine und zahlreiche Bestandteile des Blutplasmas. Die im Kammerwasser gelösten Bestandteile machen nur ein Zehntel derer des Serums aus. So ist der Glukosegehalt des Kammerwassers geringer, aber der Ascorbinsäuregehalt wesentlich höher. Einige wichtige organische und anorganische Inhaltsstoffe des Kammerwassers sind in Tabelle1 dargestellt.

Tabelle 1: einige ausgewählte Konzentrationen von Inhaltsstoffen des Kammerwassers
(modifiziert aus Caprioli 1992)

<u>Anorganische Substanzen</u>		<u>Organische Substanzen</u>	
Bikarbonat	20,2 µmol/ml	Ascorbinsäure	1,06 µmol/ml
Chlorid	131,6 µmol/ml	Glukose	2,80 µmol/ml
Kalium	3,9 µmol/ml	Laktat	4,50 µmol/ml
Natrium	152,0 µmol/ml	Protein	13,50 mg/100m
Phosphat	0,6 µmol/ml	Citrat	0,12 µmol/ml
H ⁺ -Ionen (pH)	ca. 7,5	Kreatinin	ca. 0,04 µmol/m

1.6 Wachstumsfaktoren (WF)

Wachstumsfaktoren sind körpereigene Polypeptide, die in der Art und Weise, wie sie auf ihre Zielzellen einwirken, den Polypeptid - Hormonen gleichen. Dies beinhaltet das Vorhandensein von Oberflächenrezeptoren auf den Zellen, die Art der Erzeugung des transmembranären Signals und die Wirkung auf die Genexpression. Im Gegensatz zu Hormonen werden die WF in einer Vielzahl von Zellen synthetisiert und haben ein größeres Spektrum an Zielzellen (Bradshaw und Cavanaugh 1990).

Wachstumsfaktoren fördern oft das Zellwachstum, können es aber auch hemmen. Darüber hinaus beeinflussen sie viele andere Zellfunktionen, wie z.B. die Differenzierung ihrer Zielzellen, Wundheilung, Seneszenz ect.. Zellen benutzen Wachstumsfaktoren als Signalmoleküle für die Kommunikation untereinander (Sporn und Roberts 1990).

Seit Anfang der 70er Jahre konnten durch verbesserte biochemische Techniken immer mehr Wachstumsfaktoren isoliert und ihre Struktur charakterisiert werden. Die Produktion großer Mengen jedes isolierten Faktors ist durch Kenntnis der für ihn codierenden Gene und unter Zuhilfenahme von Expressionssystemen möglich geworden (Bradshaw und Cavanaugh 1990).

Zu den bisher isolierten WF gehören u.a. der Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor), die Familie der Fibroblast Growth Factors (Fibroblasten Wachstumsfaktoren) und die Familie der Transforming Growth Factors beta (Transformierender Wachstumsfaktor Beta).

1.6.1 Der Epidermal Growth Factor (EGF)

Der Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor) wurde 1962 erstmals aus der submaxillären Drüse der Maus isoliert (Cohen 1962). Der humane EGF hat eine Sequenz von 53 Aminosäuren (Gregory 1975) und ein Molekulargewicht von 6045 Dalton. Die Konzentration von EGF im Kammerwasser beträgt bei Männern ca. 10,3 ng/ml, bei Frauen ca. 4,9 ng/ml (Shinoda et al. 1988). Die endogene Präsenz dieses WF konnte in vielen okulären Zellen nachgewiesen werden (Wilson et al. 1994).

Der EGF - Rezeptor ist ein intrinsisches Membranglycoprotein mit einem Molekulargewicht von 170000 Dalton, an dessen externer Domäne EGF spezifisch

bindet. Die Tyrosinkinaseaktivität des EGF - Rezeptors bewirkt Phosphorylierungen im Zytoplasma (Carpenter und Wahl 1990). Der Rezeptor konnte in kornealen Endothel- und Epithelzellen nachgewiesen werden (Wilson et al. 1994).

Die Wirkung von EGF auf die verschiedensten Zellarten wurde bereits erforscht. Bei okulären Zellen zeigte sich eine fördernde Wirkung auf die Proliferation (Gospodarowicz et al. 1977, Raymond et al. 1986) und Migration (Watanabe et al. 1987) von kornealen Endothelzellen und auf die Proliferation von Linseneithelzellen (Reddan und Wilson-Dziedzic 1983).

1.6.2 Die Fibroblast Growth Factors (FGF)

Die beiden Hauptformen der Familie der Fibroblast Growth Factors bilden der basische (hoher isoelektrischer Punkt) und der saure Fibroblastenwachstumsfaktor (niedriger isoelektrischer Punkt). Der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) hat ein Molekulargewicht von 16500 Dalton und besteht aus 146 Aminosäuren (Esch et al. 1985), der saure Fibroblastenwachstumsfaktor hat ein Molekulargewicht von 15500 Dalton und ist aus 140 Aminosäuren aufgebaut (Thomas et al. 1984, Esch et al. 1985). Zu ca. 55 % sind bFGF und aFGF in ihrer Sequenz identisch (Esch et al. 1985).

Der aFGF wurde z.B. in Gehirn (Lobb und Fett 1984) und Retina (Baird et al. 1985) gefunden und scheint auf das Vorkommen in neuronalem Gewebe beschränkt zu sein, wohingegen bFGF in einer Vielzahl von Zellen gefunden wurde.

Der Rezeptor für aFGF und bFGF ist ein einkettiges Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 110 - 150 kDa. Er besitzt eine hohe Affinität für beide Faktoren, die für bFGF aber höher ist als für aFGF (Baird und Böhlen 1990).

Die Wirkung von bFGF und aFGF auf eine Vielzahl von Zellen *in vitro* und *in vivo* wurde bereits untersucht. Oft zeigte sich eine stimulierende Wirkung, wie z.B. bei der Proliferation kornealer Endothelzellen *in vitro* (Gospodarowicz et al. 1977, Rieck et al. 1992).

1.6.3 Die Transforming Growth Factors beta (TGF- β)

Der TGF β wurde 1983 von Assoian et al. isoliert. Dieser Wachstumsfaktor wird heute TGF- β 1 genannt. Inzwischen sind weitere vier Isoformen bekannt (Roberts und Sporn 1990).

In humanen Geweben konnten die Isoformen TGF- β 1 (Derynck et al. 1985), TGF- β 2 (de Martin et al. 1987) und TGF- β 3 (ten Dijke et al. 1988, Derynck et al. 1988) isoliert werden. Es handelt sich um homodimerische Peptide und jeder der TGF- β s wird aus einem Vorläuferprotein (~ 400 Aminosäuren) proteolytisch in ein reifes Peptid umgewandelt (112 Aminosäuren). Die TGF- β - Isoformen sind zu 70 - 80 % identisch (Miyazono et al. 1993).

Die Wirkungen, die durch TGF- β vermittelt werden, reichen von der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration über die Stimulation von extrazellulärer Matrixsekreterung bis zur Modulation von vielen entzündlichen und immunologischen Reaktionen (Roberts und Sporn 1990).

Die TGF- β s vermitteln ihre Wirkungen durch Bindung an eigene, spezifische Rezeptoren. Ich möchte etwas näher auf die TGF- β - Rezeptoren I, II und III (T β R I, T β R II und T β R III) eingehen.

Das Verständnis der Signaltransduktion durch die TGF- β - Rezeptoren wurde stark verbessert durch die Klonierung und Charakterisierung von T β R II (Lin et al. 1992) und T β R III (Wang et al. 1991, Lopez-Casillas et al. 1991).

T β R I und T β R II sind Glycoproteine, wobei der T β R II ein Molekulargewicht von 80 kDa hat und zur Familie der Serin/Threonin - Kinase - Rezeptoren gehört. Die Struktur des T β R I ist nicht eindeutig aufgeklärt. Der T β R III ist, im Gegensatz zu allen bekannten Polypeptid - Rezeptoren, ein Proteoglykan. Er setzt sich aus einem Kernprotein von 120 kDa und Glykosaminoglykan - Seitenketten zusammen, die einen hohen Gehalt an Heparansulfat und Chondroitinsulfat haben. Zur Bindungskapazität der einzelnen Isoformen an die Rezeptoren ist zu sagen, daß T β R II mit hoher Affinität TGF- β 1 und 3 bindet, TGF- β 2 aber hauptsächlich an T β R III bindet. Wie kann nun TGF- β ein intrazelluläres Signal induzieren? Dafür müssen in jedem Falle T β R I und T β R II auf der Zelloberfläche vorhanden sein. TGF- β bindet an den T β R II, der allein kein Signal auslösen kann. Bei Bindung von TGF- β kommt es vielmehr zu einer Rekrutierung des T β R I und darauffolgenden Ausbildung eines Liganden - T β R I - T β R II - Komplexes.

Durch die Einbeziehung des T β R I in den Komplex kommt es zu einer Phosphorylierung von T β R I und damit zur Weiterleitung eines intrazellulären Signals. Der T β R III nimmt nicht direkt an der Signaltransduktion teil. Bei Bindung von TGF- β 2 an T β R III produziert dieser ein transmembranäres Signal, welches T β R II präsentiert wird (Lopez-Casillas et al. 1993).

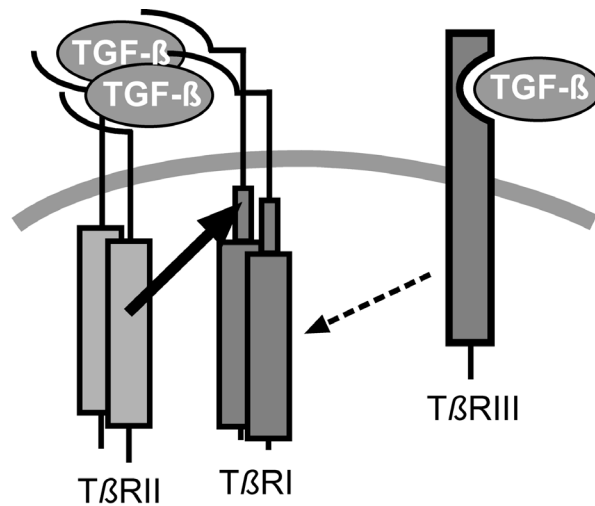


Abb. 1.1 Darstellung TGF- β -Rezeptor III und Rezeptorkomplex aus TGF- β -Rezeptor I und II (modifiziert aus Heldin et al. 1997)

Die drei besprochenen Rezeptoren sind auf der Oberfläche kornealer Endothelzellen zu finden (Joyce und Zieske 1997). Es können also die im Kammerwasser enthaltenen TGF- β - Isoformen auf die Endothelzellen einwirken.

1.6.3.1 Der Transforming Growth Factor Beta 2 (TGF- β 2)

Der TGF- β 2 ist ein homodimerisches Peptid mit einer dreidimensionalen Struktur. Jede Kette ist aus 112 Aminosäuren aufgebaut, die zu zwei antiparallelen β -Faltblättern und drei α -Helices zusammengesetzt und zusätzlich durch acht Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Ketten stabilisiert die dimerische Struktur. Jedes TGF- β 2 - Monomer ähnelt in seinem Aufbau einer ausgestreckten Hand (siehe Abb.1.2.) und bildet so kein kompaktes, globuläres Protein (Miyazono et al. 1993).

Humanes Kammerwasser hat einen hohen Gehalt an TGF- β . Die höchste Konzentration wurde für TGF- β 2 gefunden (1-3 ng/ml), der überwiegend in aktiver Form vorliegt.

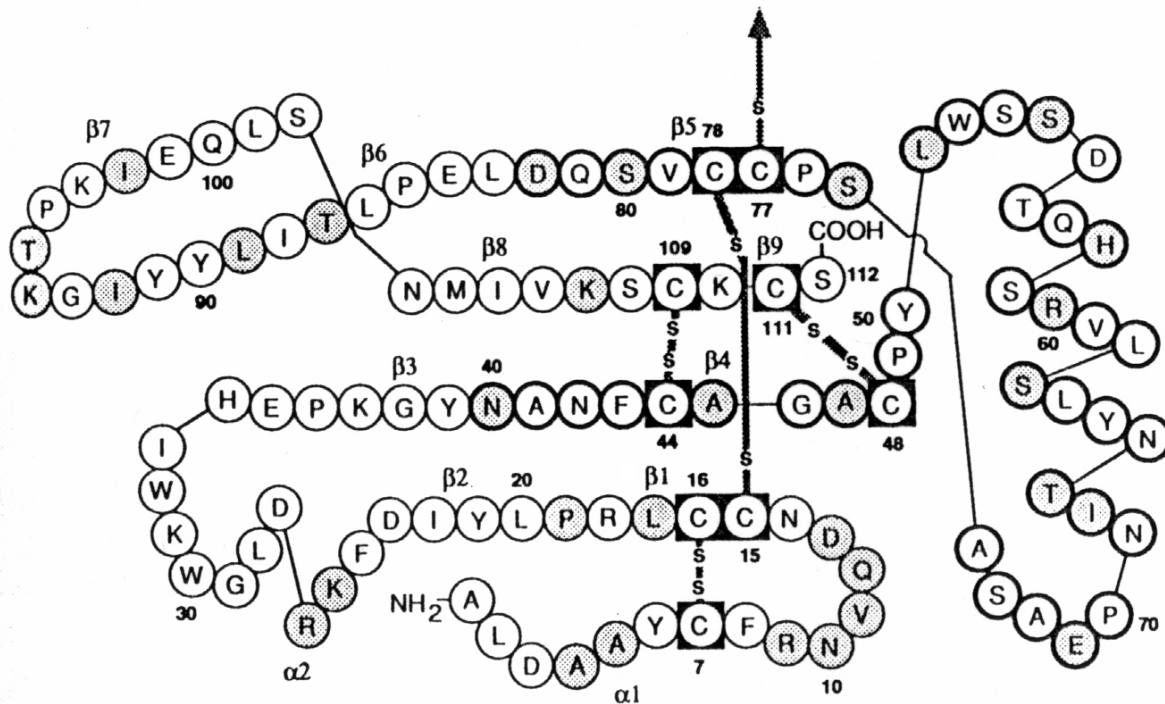


Abb. 1.2. Struktur von TGF- β 2 (aus Miyazono et al. 1993)

1.7 L-Ascorbinsäure (Friedrich 1987, Nobile und Woodhill 1981)

L-Ascorbinsäure ist ein 2,3-Endiol-L-gulonsäure- γ -lacton. Als Redoxsystem des Vitamin C bezeichnet man die 3 Verbindungen L-Ascorbinsäure, Dehydro-L-Ascorbinsäure und die radikalische Zwischenstufe, genannt Monodehydroascorbinsäure (siehe Abb. 1.4.). Aus L-Ascorbinsäure entsteht durch Oxidation Dehydroascorbinsäure, die durch Reduktion mit H_2S zu L-Ascorbinsäure regeneriert werden kann. Ascorbinsäure liegt als weißes, farbloses Kristallpulver vor, das aus quadratischen oder etwas länglichen monoklinen Kristallen besteht und gehört zu den wasserlöslichen Vitaminen (siehe Abb. 1.3.). Die erstmalige Isolierung gelang 1928 und durch Strukturaufklärung ist seit 1933 die chemische Synthese möglich.

Für den menschlichen Organismus ist Ascorbinsäure essentiell, da das Enzym L-Gulonolacton - Oxidase im Laufe der Evolution durch Mutation verloren ging. Vielen

Tierarten, die diesen Mangel nicht aufweisen, ist es möglich, aus Glukose selbst Ascorbinsäure zu bilden.

Der tägliche Bedarf an Ascorbinsäure beträgt ca. 20-30 mg. Davon werden 80-90 % im Duodenum, Jejunum und über die Mundschleimhaut durch einen Carrier - und Na^+ -abhängigen aktiven Transport resorbiert.

Im menschlichen Körper ist Ascorbinsäure in hoher Konzentration in stoffwechselaktiven Geweben zu finden. So liegt Vitamin C in sehr hoher Konzentration in Nebenniere, Hypophyse, Gehirn, Augenlinse, Milz, Leber und Pankreas vor.

Eine hohe Ascorbinsäurekonzentration ist auch im Kammerwasser zu finden. Sie beträgt ca. 100 µg/ml und somit das Doppelte der Ascorbinsäurekonzentration des Serums.

Die Wirkungen der Ascorbinsäure sind vor allem ihrer Eigenschaft als Redoxpartner zuzuschreiben. Als biochemisches Redoxsystem ist das Vitamin C an vielen Elektronentransportreaktionen beteiligt. Zu den bekanntesten biochemischen Reaktionen, die durch Vitamin C stimuliert werden, zählen Hydroxilierungen.

Zu einigen wichtigen Funktionen gehören die Beteiligung an der Kollagensynthese (Katalyse durch Ascorbinsäure), die Bedeutung beim Abbau der Aminosäure Tyrosin, die Funktion als Cofaktor bei der Synthese von Noradrenalin sowie die antioxidative Wirkung als Radikalfänger z.B. zum Schutz vor lichtinduzierten Gewebeschäden. Bei der letztgenannten Funktion reagiert Ascorbinsäure mit den toxischen Formen des Sauerstoffs, dem Superoxidanion und dem Hydroxylradikal. Dabei entsteht Monodehydroascorbinsäure, die rasch zu Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure disproportioniert wird.

Neben diesen biochemischen Wirkungen nimmt Ascorbinsäure einen Einfluß auf Zellteilungs - und Differenzierungsprozesse. So wurden antiproliferative (Knorr et al. 1996) bzw. zelltoxische (Wunderlich et al. 1992) als auch proliferationsfördernde (Liso et al. 1984) Effekte gezeigt.

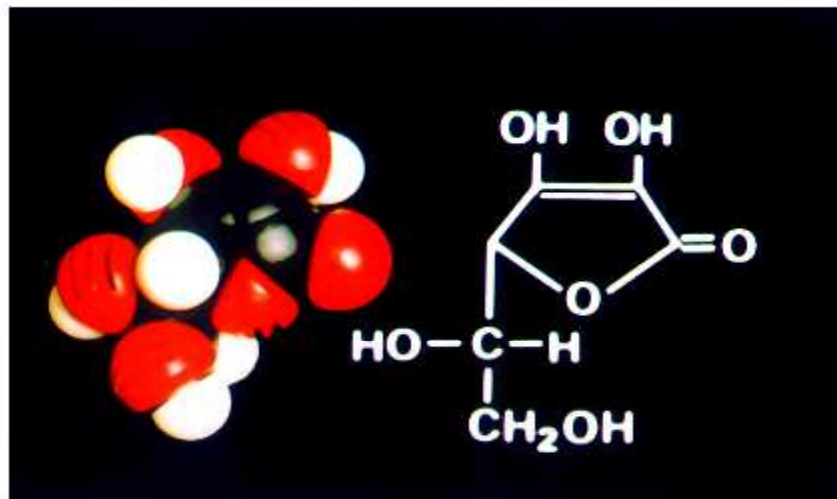
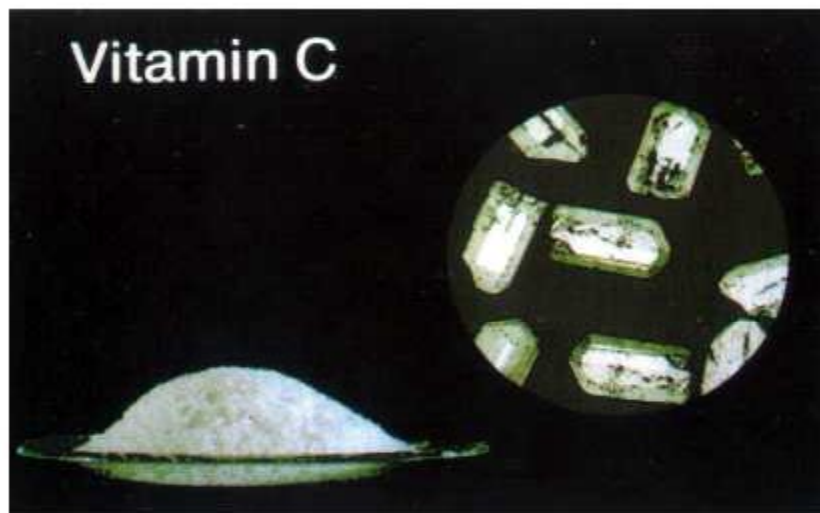


Abb. 1.3. Vitamin C (aus Friedrich 1987)

L-Ascorbinsäure
(reduziert)

Dehydro-L-Ascorbinsäure
(oxidiert)

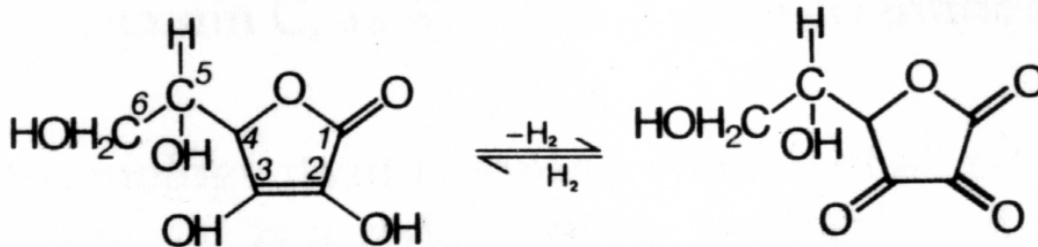


Abb. 1.4: Redoxsystem des Vitamin C, Strukturformeln der L-Ascorbinsäure und der Dehydro-L-Ascorbinsäure (aus Friedrich 1987)

1.7.1 Zusammenhang mit Lipoxxygenase

Arachidonsäure wird über drei verschiedene enzymatische Wege zu biologisch aktiven Eicosanoiden metabolisiert (Needleman et al. 1986, Abb. 1.5.).

Das Enzym Cyclooxygenase bildet aus Arachidonsäure Prostaglandine, Prostacyclin und Thromboxan.

Der Arachidonsäure - Stoffwechsel durch Epoxxygenase ist abhängig von Cytochrom P450 - Monooxygenasen. Zu den entstehenden Metaboliten gehören Epoxyeicosatrienoicssäure, 12-R-Hydroxyeicosatetraenoicssäure und 12-R-Hydroxyeicosatrienoicssäure.

Lipooxygenase wandelt die Arachidonsäure zu Hepoxillinen, Lipoxinen, Leukotrienen und den instabilen Hydroperoxyeicosatetraenoicssäuren (HPETEs) um, aus denen rasch Hydroxyeicosatetraenoicssäuren (HETEs) gebildet werden. 12-Lipoxxygenase katalysiert die Oxidation von Arachidonsäure zur instabilen 12-HPETE, bzw. zur stabilen 12-S-HETE.

Das Hauptprodukt des Arachidonsäurestoffwechsels in kornealen Zellen von Ratten ist 12-S-HETE, was aussagt, daß der Lipoxxygenaseweg den vorherrschenden Weg der Metabolisierung von Arachidonsäure in kornealen Zellen darstellt (Hurst et al. 1991).

Die Zellproliferation epidermaler Zellen wird durch Lipoxxygenase und die durch ihre Katalysierung entstehende 12-S-HETE günstig beeinflußt (Chan et al. 1985). Es wurde bereits gezeigt, daß eine Hemmung der Lipoxxygenase eine Verzögerung der Wundheilung kornealer Rattenepithelzellen zur Folge hat (Gupta et al. 1992).

Durch Williams et al. wurde nachgewiesen, daß Ascorbinsäure die Bildung von 12-S-HETE durch korneale Zellen inhibiert (Williams et al. 1986).

Es besteht also die Möglichkeit, einen evtl. hemmenden Effekt von Ascorbinsäure auf den Lipoxxygenaseweg des Arachidonsäuremetabolismus durch Zugabe von 12-S-HETE zu vermindern.

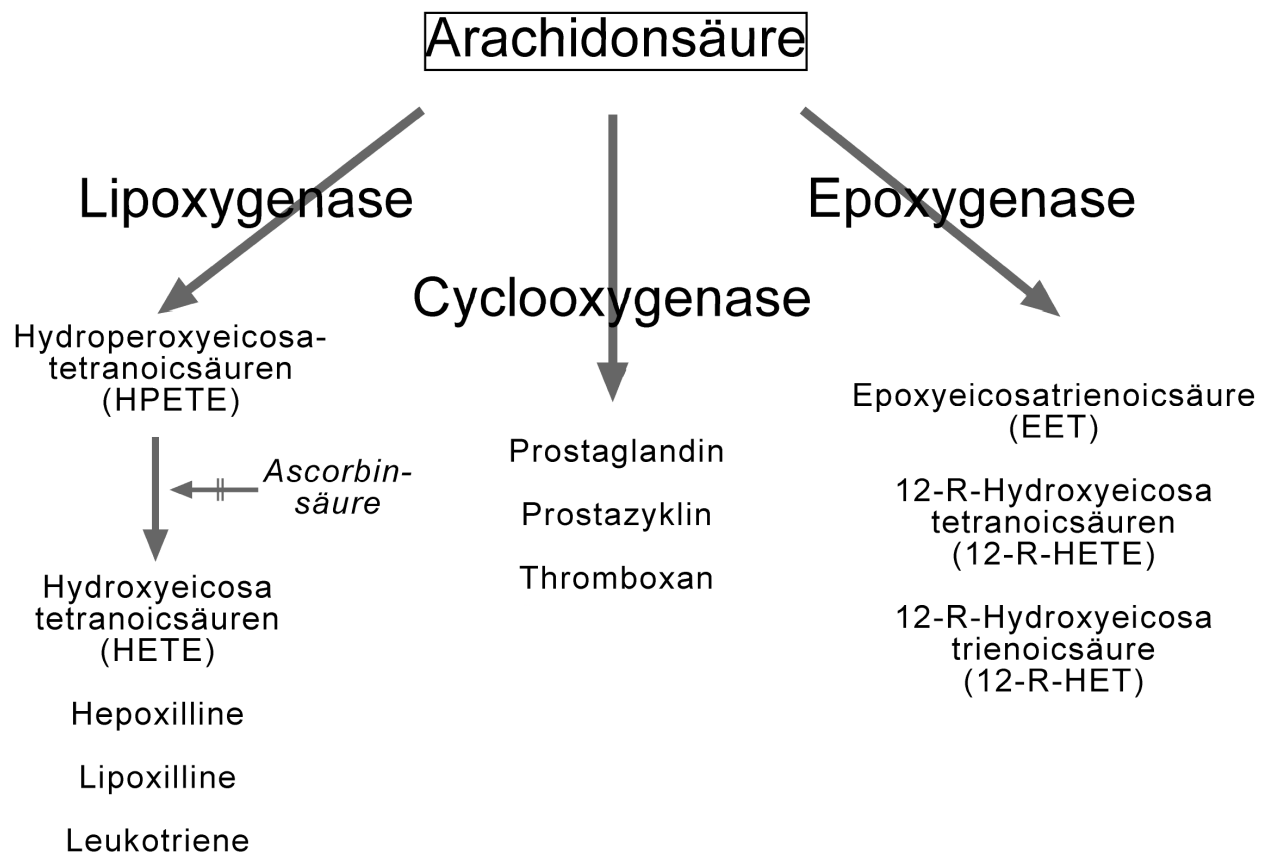


Abb. 1.5: Metabolisierung von Arachidonsäure

2 Ziel der experimentellen Arbeit

Die Regenerationsfähigkeit des Hornhautendothels ist sehr begrenzt. So kann es mit fortschreitendem Lebensalter und durch zusätzliche Einflüsse wie Trauma oder intraokulare Chirurgie zu einer Endotheldekompensation kommen. Daraus resultiert eine ausgeprägte Einschränkung der Sehfähigkeit durch eine irreversible Hornhauttrübung.

An Zellen in Kultur läßt sich die Induktion und Modulation von Proliferation und Migration des Hornhautendothels innerhalb des Wundheilungsprozesses ideal studieren.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, endogene Faktoren aufzudecken, die möglicherweise einen hemmenden Einfluß auf die Wundheilung des Hornhautendothels haben.

Da das Kammerwasser die Endothelzellen *in vivo* an ihrer Rückseite umspült, soll der Einfluß von Kammerwasser selbst sowie von Inhaltsstoffen des Kammerwassers untersucht werden. Der Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor Beta 2 und L-Ascorbinsäure liegen in sehr hoher Konzentration im Kammerwasser vor und haben in Zellkulturstudien, aber auch in tierexperimentellen Studien gezeigt, daß sie einen hemmenden Einfluß auf das Zellwachstum anderer Zelllinien haben können.

Es wurde mit bovinen kultivierten Endothelzellen gearbeitet. Die Proliferation und die Migration wurden separat in zwei verschiedenen Modellen untersucht.

Da ein zelltoxischer Effekt von L-Ascorbinsäure beschrieben wird, wurden zusätzlich Vitalitätsprüfungen durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Für die Gewinnung der Endothelzellen wurden Rinderaugen aus einem nahegelegenen Schlachthof verwendet. Die Bulbi wurden direkt post mortem enukleiert und, auf Eis gelagert, in unser Labor transportiert. Vor der weiteren Präparation wurden die Bulbi maximal vier Stunden bei 4 °C in der feuchten Kammer gelagert. Es wurden nur Augen verwendet, die keine Epitheldefekte und kein Hornhautödem aufwiesen.

3.1.2 Laborinventar

3.1.2.1 Gefäße

- sterile Bechergläser, Petrischalen und Glasflaschen (mit Verschuß)
- sterile 50 ml Plastikröhrchen
- sterile 15 ml Zentrifugenröhrchen
- Easy Flow-Sterilfilter
- 6 und 12 Well Kulturschalen

3.1.2.2 Instrumente

- 1 Schere
- 3 sterile Pinzetten
- 1 sterile gebogene Schere
- 1 steriles Skalpell
- 1 steriles Hockeymesser
- Eppendorfpipetten (1000 µl, 100 µl) mit sterilen Pipettenspitzen
- sterile Einmalpipetten (10 ml, 25 ml)
- 1 steriler Trepan (5,5 mm)

3.1.2.3 Geräte

- sterile Werkbank mit Laminar Flow und Abflammgerät
- Brutschrank
- Kühlschrank
- Gefrierschrank
- Wasserbad
- inverses Mikroskop mit Kamera
- Zentrifuge
- Autoclaviergerät
- Heißluftsterilisator
- Stoppuhr
- Pipettierhilfe
- Neubauer - Zählkammer

3.1.3 Medium und Lösungen

3.1.3.1 Zusammensetzung des Kulturmediums

- 100,0 ml DMEM (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)
- 2,5 ml HEPES mit pH 7,2 (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg)
- 1,0 ml L-Glutamin (GIBCO BRL, Schottland)
- 1,0 ml Penicillin/ Streptomycin (Sigma, St.Louis, U.S.A.)
- 0,1 ml Gentamycin (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)
- 10,0 oder 5,0 ml fetales Kälberserum (GIBCO BRL, Paisley, Schottland)

Die fertige Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde das Kulturmedium auf Zimmertemperatur erwärmt.

3.1.3.2 Sonstige Lösungen

- PBS - Pufferlösung
 - 8,1 g Natriumchlorid
 - 100 ml Phosphatpuffer pH 7,2

900 ml Aqua dest.

sterilfiltrieren

- PBS/EDTA-Lösung

100 ml PBS - Pufferlösung

0,02 g EDTA

sterilfiltrieren

- PBS - Natriumthiosulfat - Lösung

1000 ml PBS - Pufferlösung

1 g Natrium - Thiosulfat

sterilfiltrieren

- 1 % ige Trypsin/EDTA-Lösung

9 Teile sterile PBS-Lösung

1 Teil steriles Trypsin/EDTA

- Giemsa - Farbsubstratlösung

je 0,5 ml Giemsa auf 10 ml mit Aqua dest. auffüllen

- Absoluter Methanol

- Trypan - Blau - Farbsubstrat - Lösung

Herstellen einer 0,5 %igen Lösung mit PBS – Pufferlösung

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation und Anlegen der Primärkultur

Die Bulbi wurden nach dem Eintreffen im Labor unter fließendem Wasser gewaschen. Augen mit einem sichtbaren Epitheldefekt, Einblutungen oder Hornhauttrübungen wurden nicht verwendet. Mit einer Schere wurde das anhängende Bindegewebe entfernt. Die gesäuberten Bulbi wurden für 5 min in einer 2,5 % igen PVP- Jodlösung desinfiziert. Zur Titration des Jods wurden die Bulbi 5 min in PBS – Natriumthiosulfat - Pufferlösung gespült und verweilen weitere 5 min in PBS - Pufferlösung. Zur Präparation der Korneoskleralscheiben wurde die Sklera mit einem Skalpell im Abstand von 2-3 mm vom Limbus inzidiert und der Schnitt mit einer gebogenen Schere zirkulär erweitert. Die Korneoskleralscheibe konnte dann mit einer Pinzette vorsichtig von der Iris abgehoben werden. Es wurden 12 - 15 Hornhautscheiben präpariert und in PBS -

Pufferlösung bei 4 °C gesammelt. Zur Ablösung der Endothelzellen wurde die Hornhaut mit dem Endothel nach oben zeigend in eine sterile Petrischale gelegt. Mit einem Hockeymesser wurden die Endothelzellen vorsichtig von der Descemet - Membran abradert. Die Zellen wurden in 2 ml PBS - Pufferlösung in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und 7 min mit einer Trypsin/EDTA - Lösung der Endkonzentration 1% inkubiert. Durch das Trypsin sollen die Interzellularräume erweitert werden. Das Zentrifugenröhrchen wurde dann mit Kulturmedium+10% fetales Kälberserum (FCS) aufgefüllt und bei 1000 U/min und 15 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte durch gleichmäßiges Verteilen der Zelllösung auf einer 6 Well-Kulturschale in je 2 ml Kulturmedium+10% FCS. Alle 2 - 3 Tage wurde das Medium gewechselt. Nach 12 - 14 Tagen war ein konfluenten Zellrasen gewachsen. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37 °C gelagert. Bei fortgeschrittener Konfluenz wurde der Serumanteil im Kulturmedium auf 5% reduziert. Von der Aussaat bis zur Konfluenz wurden die Zellen regelmäßig mit einem Lichtmikroskop beurteilt. Eine genaue Beobachtung des Zellwachstums ist besonders wichtig, da es zu einer Kontamination mit Fibroblasten kommen kann, die dann die Kulturen überwuchern.

3.2.2 Passage der Primärkultur

Für die weitere Verwendung wurden die konfluenten Zellkulturen passagiert. Dazu wurde jedes Well der Kulturschale mit 1 ml PBS - Lösung und 1 ml PBS/EDTA - Lösung gespült und anschließend mit 1fach konzentrierter Trypsin/EDTA - Lösung 7 min inkubiert. Unterstützt wurde der Ablösevorgang durch Schütteln und Klopfen der Kulturschale. Die Trypsin/EDTA - Lösung mit den abgelösten Zellen wurde in einem Zentrifugenröhrchen mit der 10 fachen Menge Kulturmedium+10% FCS gesammelt und bei 1000 U/min und 15 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Kulturmedium+5% FCS resuspendiert. Die Zellzahl/µl wurde mit der Neubauer - Zählkammer bestimmt.

3.2.3 Proliferationsassay

Für die Experimente zur Untersuchung der Proliferation wurden die Endothelzellen der ersten Passage zu 15.000 Zellen / Well auf 12-Well-Kulturschalen in je 1 ml Kulturmedium+5% FCS ausgesät. Nach 6 - 8 Stunden hatten sich die vitalen Zellen am Kulturschalenboden angeheftet. Die Experimente wurden 12 Stunden nach Aussaat der Zellen gestartet. Das Medium wurde abgenommen und frisches Kulturmedium+5% FCS mit Zusatz der zu untersuchenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen dazugegeben (1 ml / Well). Nach abgelaufener Inkubationszeit im Brutschrank von 3 oder 4 Tagen wurden die Experimente abgebrochen. Das Vorgehen dabei war der Prozedur des Passagierens ähnlich. Nach Abnehmen des Mediums und Waschen mit PBS - Pufferlösung und PBS/EDTA - Lösung wurden die Kulturen mit Trypsin/EDTA - Lösung (300 µl/ Well) für 7 min inkubiert. Dieser Vorgang wurde durch Schütteln und Klopfen der Kulturschale unterstützt. Unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob sich alle Zellen vom Kulturschalenboden gelöst haben. Die gelösten Zellen wurden in separaten Zentrifugenröhrchen mit der 10 fachen Menge Kulturmedium+10% FCS gesammelt und bei 1000 U/min und 15 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 100 µl Kulturmedium+5% FCS resuspendiert. Mit der Neubauer - Zählkammer wurden die Zellen in vier Großquadraten gezählt, die Zellzahl / Well bestimmt und der Mittelwert berechnet.

3.2.4 Wundassay

Für die Experimente zur Untersuchung der Migration wurden die Endothelzellen der ersten Passage mit einer Zellzahl von 25.-30.000 Zellen/ Well auf 12 Well-Kulturschalen in je 1 ml Kulturmedium+5% FCS ausgesät. Der Durchmesser eines Wells beträgt 2,5 cm. Nach spätestens 5 Tagen waren die Zellkulturen im Brutschrank zur Konfluenz herangewachsen und standen für die Experimente zur Verfügung. Mit einem Trepan vom Durchmesser 5,5 mm wurden zirkuläre, zentrale Wunden in den Zellrasen gestanzt. Der Trepan wurde in seinem Hohlraum durch einen Gummi ausgefüllt, der den unteren Rand um 1 - 2 mm überragte (siehe Abb. 3.1.). Somit wurden beim Setzen der Wundläsion die Zellen im Wundinneren abradiert. Der initiale

Wundrand blieb durch die Stanzmarkierung des Trepanns über den gesamten Versuchsablauf sichtbar.

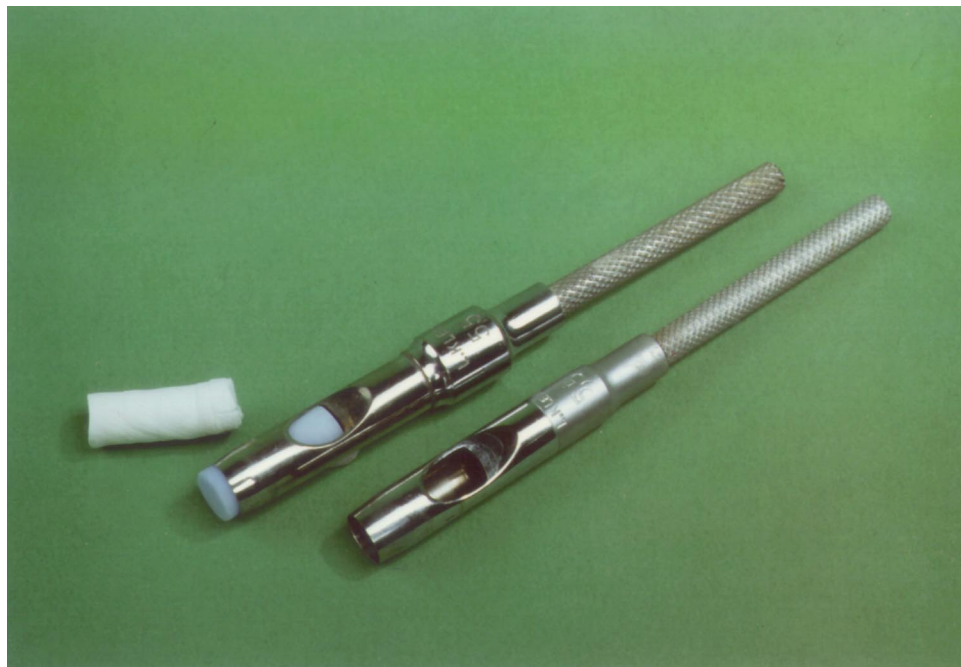


Abb. 3.1: Trepan

Direkt nach Setzen der Wunden wurde das Medium abgenommen und die Zellkulturen mit je 1 ml Kulturmedium+5% FCS/ Well gewaschen. Anschließend wurde je 1 ml frisches Kulturmedium+5% FCS, das die zu untersuchenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen enthielt, zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 3 oder 4 Tagen wurden die Experimente abgebrochen. Dafür wurden die Zellkulturen mit 1 ml PBS - Pufferlösung / Well gewaschen und mit absolutem Methanol fixiert. Nach Abnehmen des Methanols und Zugabe von PBS - Pufferlösung konnten die Zellkulturen bei 4 °C zwischengelagert werden.

Zur Auswertung und Photodokumentation wurden die Zellkulturen angefärbt. Die verwendete Giemsa - Farbsubstrat - Lösung mußte 10 min einwirken und durch mehrmaliges Spülen mit Aqua dest. ausgewaschen werden. Anschließend wurden die Kulturen luftgetrocknet. Durch den rot - violetten Farbstoff Giemsa wurden die Zellkerne und das Zellplasma angefärbt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Zählraster (Abb. 3.2.) bei 160 facher Vergrößerung. Die Zellen wurden an 5 verschiedenen Stellen, ausgehend vom Wundrand gezählt. Jede Stelle hatte die Flächengröße 0,25 mm², entsprechend 5x5 Kästchen. Der auswertenden Person waren die Daten zu den ihr vorliegenden Experimenten unbekannt.

Aus den Zahlenwerten der 5 ausgezählten Areale wurde ein Mittelwert berechnet

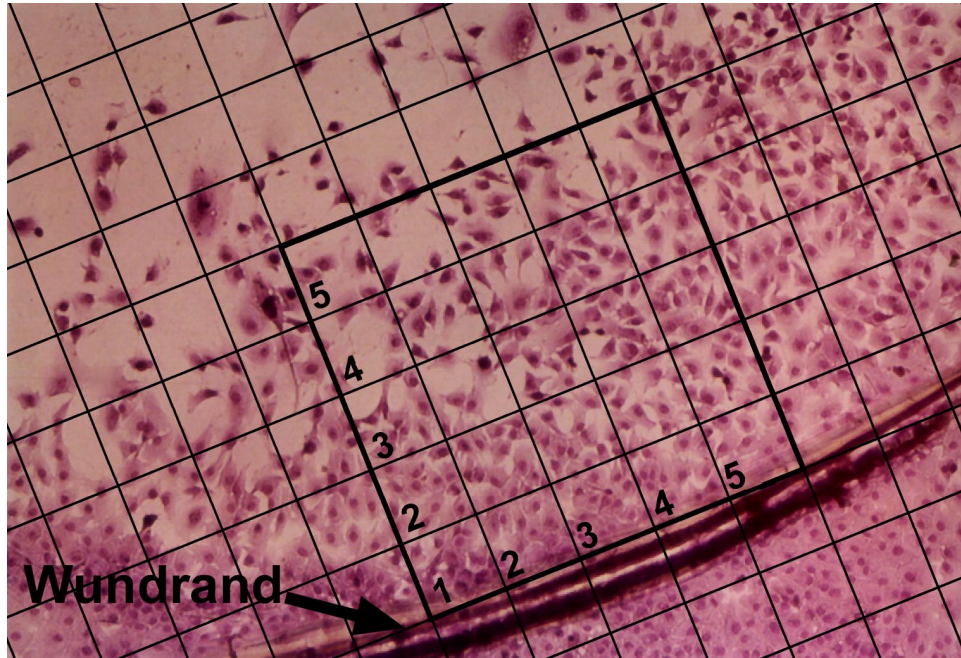


Abb. 3.2: Zählraster

3.2.5 Proliferations - Experimente

Alle Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt, wobei für jede Konzentration einer getesteten Substanz drei Wells verwendet wurden.

3.2.5.1 Humanes Kammerwasser

Das Kammerwasser wurde bei Standard - Kataraktextraktionen im Operationssaal der Augenklinik am Campus Virchow - Klinikum der Charité entnommen. Die Patienten hatten keine Erkrankungen, die u.U. Einfluß auf die Zusammensetzung des Kammerwassers nehmen und waren nicht voroperiert. Es konnten ca. 100 µl

Kammerwasser/ Kataraktextraktion gewonnen werden. Die Proben wurden in sterilen Eppendorf - Behältern gesammelt und bei -20 °C gelagert. Nach spätestens 2 Monaten wurde das Kammerwasser in den Experimenten verwendet.

Das so gewonnene humane Kammerwasser wurde in unverdünnter Form und als 10%ige Lösung in Kulturmedium+5% FCS zwölf Stunden nach Aussaat zu den Endothelzellen gegeben. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen vom Kulturschalenboden abgelöst und gezählt.

3.2.5.2 TGF- β 2

Der Wachstumsfaktor TGF- β 2 (R&D Systeme, Wiesbaden) wurde in den Konzentrationen 0,1, 1 und 10 ng/ml Kulturmedium+5% FCS verwendet. Die Inkubationszeit betrug 96 Stunden. Es wurden zur Kontrolle Zellen mit frischem Kulturmedium+5% FCS ohne Zusatz von TGF- β 2 inkubiert.

3.2.5.3 Ascorbinsäure

Ascorbinsäure (Sigma, U.S.A.) wurde in den Konzentrationen 50, 100 und 200 μ g/ml verwendet. Die Zellzahl/Well wurde nach den beiden Inkubationszeiten, 72 und 96 Stunden, bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Zellzahlen von Kulturen bestimmt, bei denen dem Medium keine Ascorbinsäure zugesetzt wurde.

In einem zusätzlichen Versuch wurde dem Medium, welches bereits Ascorbinsäure in der Konzentration 50 μ g/ml enthielt, 12-S-HETE (Sigma, U.S.A.) in der Konzentration 0,1 μ M zugesetzt.

3.2.6 Wundmodell - Experimente

Durch das Wundmodell kann die Migration kornealer Endothelzellen untersucht werden. Die Zellzahl der über den Wundrand eingewachsenen Zellen stellt ein Maß für die Migrationsrate der Zellen dar. Durch das Waschen der Zellkulturen direkt nach Wundläsion und Zusetzen der zu untersuchenden Faktoren zu frischem Kulturmedium, kann ihr exogener Einfluß auf die Zellen untersucht werden.

Alle Wundmodell - Experimente wurden drei Mal durchgeführt und für jede Versuchsgruppe drei Wells ausgewertet.

3.2.6.1 Humanes Kammerwasser

Im Experiment wurde der Einfluß von unverdünntem Kammerwasser und auf 10% Kammerwasser im Kulturmedium+5% FCS untersucht. Kontrollgruppen wurden nur mit Kulturmedium+5% FCS inkubiert. Nach 3 Tagen Inkubationszeit wurden die Versuche ausgewertet und photodokumentiert.

3.2.6.2 TGF- β 2

Der im Kammerwasser enthaltene Wachstumsfaktor TGF- β 2 wurde in den Konzentrationen 0,1, 1, und 10 ng/ml Kulturmedium+5% FCS verwendet. Diese Konzentrationen sind mit der TGF- β 2 - Konzentration im Kammerwasser vergleichbar. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Zusatz von TGF- β 2 zum Kulturmedium. Die Experimente wurden nach 3 Tagen ausgewertet und photodokumentiert.

3.2.6.3 Ascorbinsäure

Verwendet wurde L-Ascorbinsäure (Sigma, U.S.A.). Die Konzentration im Kammerwasser beträgt ca. 50-100 μ g/ml. In den Experimenten wurden die Konzentrationen 50, 100, und 200 μ g/ml verwendet. Dazu wurde aus dem wasserlöslichen Vitamin eine Lösung der Konzentration 100 mg/ml in Aqua dest. hergestellt. Diese Lösung wurde dann zur Herstellung der verwendeten Konzentrationen in Kulturmedium+5%FCS benutzt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Zugabe von Ascorbinsäure zum Medium.

Nach einer Inkubationszeit von drei oder vier Tagen wurden die Experimente abgebrochen, ausgewertet und photodokumentiert.

3.2.7 Toxizitätstests

Um eine eventuelle toxische Wirkung von TGF- β 2 und Ascorbinsäure auf die Endothelzellen beurteilen zu können, wurden Vitalitätsprüfungen durchgeführt. Es wurde eine 0,5 % ige Trypanblau - Farblösung verwendet. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen. Nach Spülung mit PBS - Pufferlösung wurde je 150 μ l Trypanblau - Farblösung zu den Zellen gegeben. Nach

einer Einwirkzeit von 1 min wurden die Zellen mit je 1 ml PBS - Pufferlösung gespült und mit absolutem Methanol fixiert. Das Färbeergebnis wurde photodokumentiert.

Trypanblau ist ein Farbstoff, der zur Vitalitätsprüfung *in vivo* und *in vitro* verwendet werden kann. Er permeiert in geschädigte Zellen und färbt den Zellkern blau an. Besonders günstig ist die anschließende Fixierbarkeit des Färbeergebnisses.

3.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung aller Versuche erfolgte unter Zuhilfenahme des Computer - Statistikprogrammes Jandel Scientific, Sigma Stat Version 1.0.

Es wurden zwei verschiedene Tests verwendet. Bei dem ersten handelt es sich um den Student's t-Test. Er vergleicht ungepaarte Stichproben, die normalverteilt sind und die gleiche Varianz haben, auf ihre Signifikanz zueinander. Der zweite verwendete Test ist der Whitney - Man Rank Sum Test. Er kam zum Einsatz, wenn keine Normalverteilung und/oder Varianz der Stichproben vorlag. Ein p - Wert von $< 0,01$ wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Humanes Kammerwasser

4.1.1 Proliferationsversuche

Der Einfluß von unverdünntem und 10% igem humanen Kammerwasser (KW) in Kulturmedium+5%FCS auf die Proliferation der bovinen kornealen Endothelzellen (BCEC) ist in Abbildung 4.1. dargestellt. Angegeben ist die Zellzahl/Well in Prozent. Die Inkubationszeit betrug 72 Stunden und die Versuche wurden direkt nach den 72 Stunden abgebrochen. Es wurden zwei Versuchsansätze mit je drei Wells pro Untersuchungsgruppe (Kontrolle, KW 100% und KW 10 %) durchgeführt. Es ergab sich eine signifikante Inhibierung der Proliferationsrate der Zellen ($p < 0,005$). Für unverdünntes Kammerwasser betrug die Hemmung nahezu 100 %, für 10%iges Kammerwasser in Kulturmedium 30 % im Vergleich zur Kontrolle.

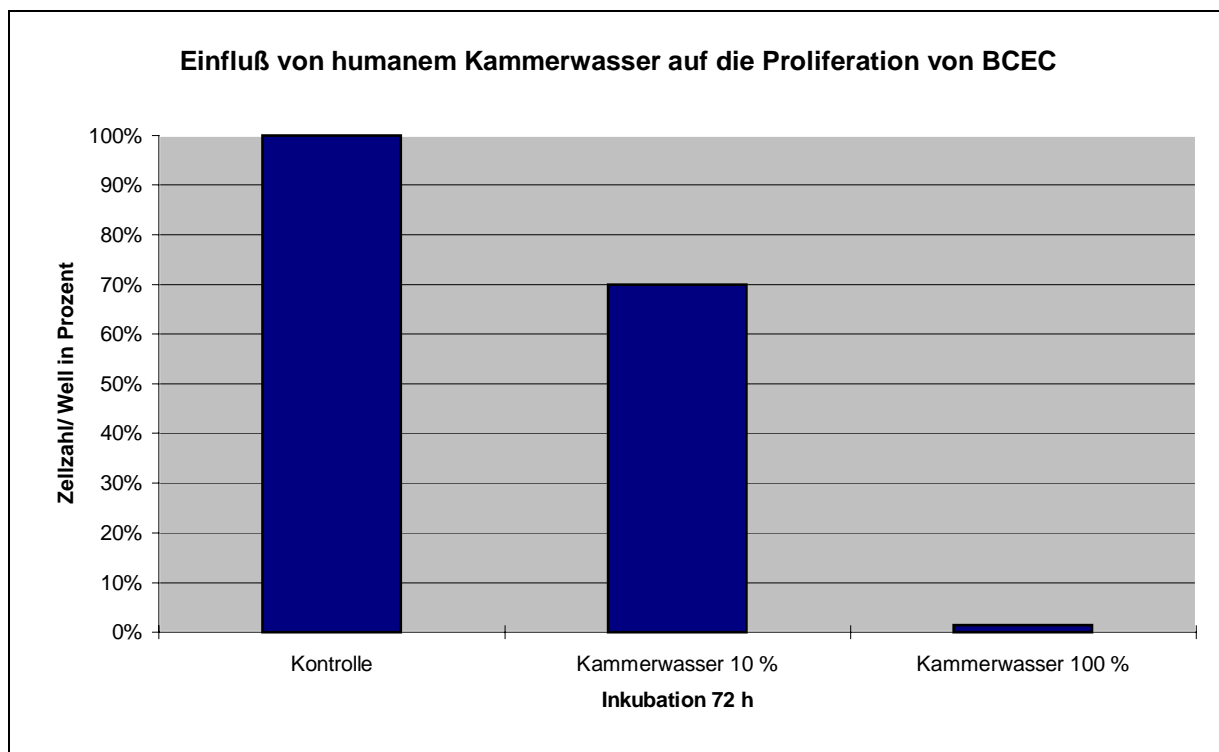


Abb. 4.1

4.1.2 Wundmodellversuche

Die in den Wundversuchen untersuchte Migration der BCEC, sowie der Einfluß von unverdünntem humanen Kammerwasser und 10%igem Kammerwasser in Kulturmedium ist in Abbildung 4.2. dargestellt. Die Ergebnisse sind als Zellzahl in Prozent / 0,25 mm² auf der Ordinate aufgetragen.

Auch auf die Migration der BCEC hatte humanes Kammerwasser einen hemmenden Einfluß. Dabei lag auch hier die Migrationsrate der Zellkulturen unter Einfluß von 10%igem Kammerwasser in Kulturmedium bei 70% der Kontrollzellkulturen ($p < 0,0001$). Unverdünntes humanes Kammerwasser hatte einen stark inhibierenden Einfluß auf die Migration. Die Migrationsrate betrug 15% der Kontrolle ($p < 0,0001$). Die Ergebnisse wurden photodokumentiert und sind mit je einem Ausschnitt in Abb. 4.3. - 4.5. dargestellt.

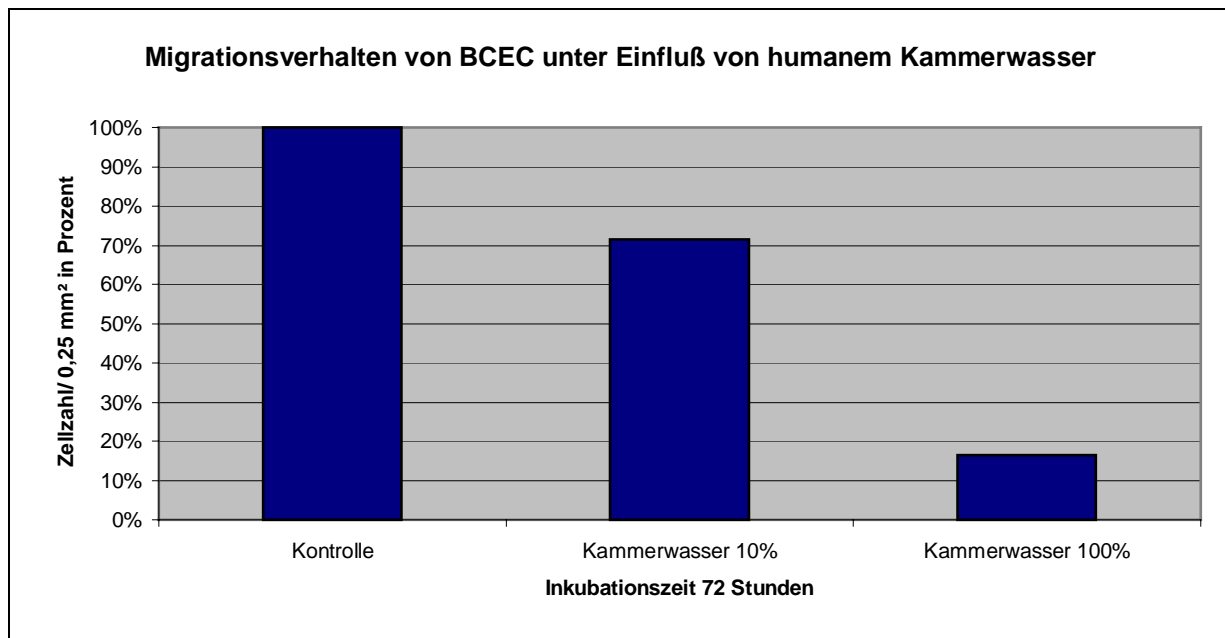


Abb. 4.2:

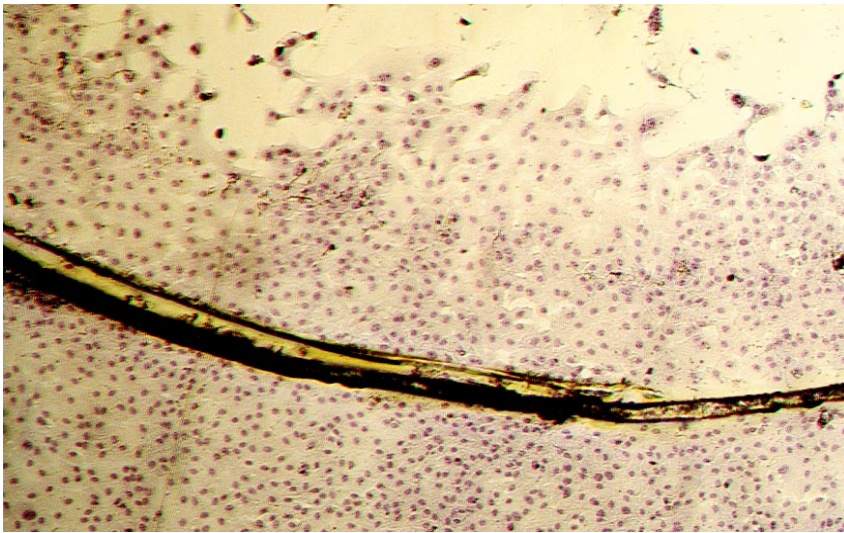


Abb. 4.3: Kontrolle

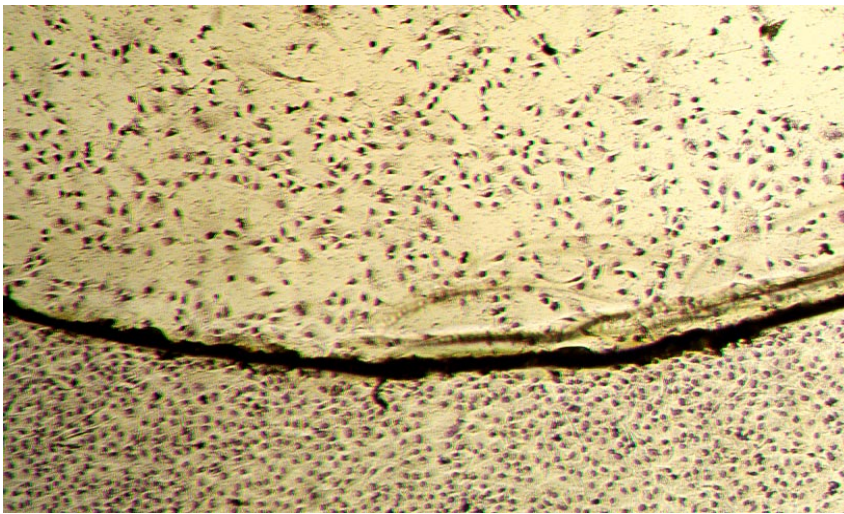


Abb. 4.4: 10%iges Kammerwasser

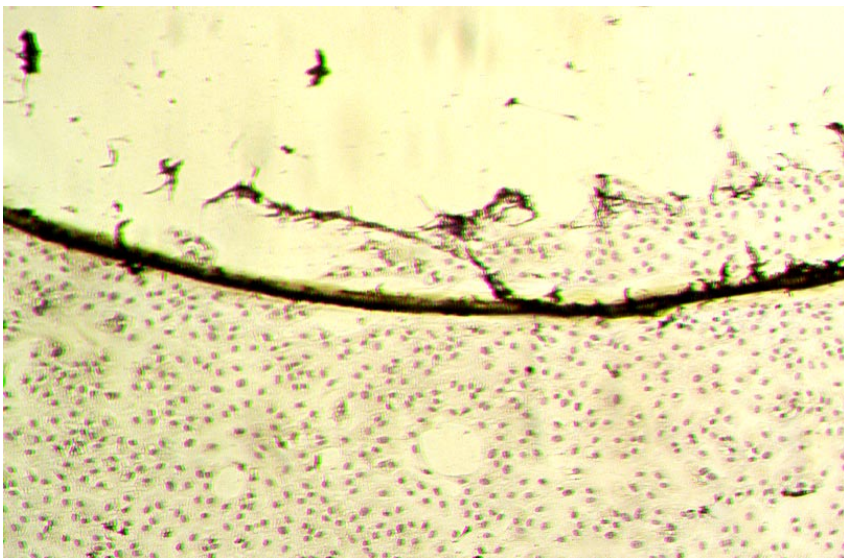


Abb. 4.5: unverdünntes Kammerwasser

4.2 Transforming Growth Factor Beta 2 (TGF- β 2)

4.2.1 Proliferationsversuche

TGF- β 2 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen: 0,1, 1 und 10 ng/ml Kulturmedium +5% FCS zu den Zellen gegeben. Die Auswirkungen auf die Proliferationsrate nach vier Tagen sind in Abbildung 4.6. dargestellt. Die Versuche wurden drei Mal durchgeführt, bei jeweils drei Ansätzen/ Konzentration.

Für alle drei Konzentrationen von TGF- β 2 ist eine Stimulation der Poliferationsrate nachweisbar, die höchste Stimulationsrate wurde bei den TGF- β 2 - Konzentrationen 0,1 und 1 ng/ml Medium gemessen. Die Werte sind im Vergleich zur Kontrolle für alle drei Konzentrationen signifikant ($p < 0,001$). In einem vierten Versuchsansatz wurden die Zellkulturen fixiert und gefärbt. Die Photodokumentation ist in Abb. 4.7. - 4.10. dargestellt.

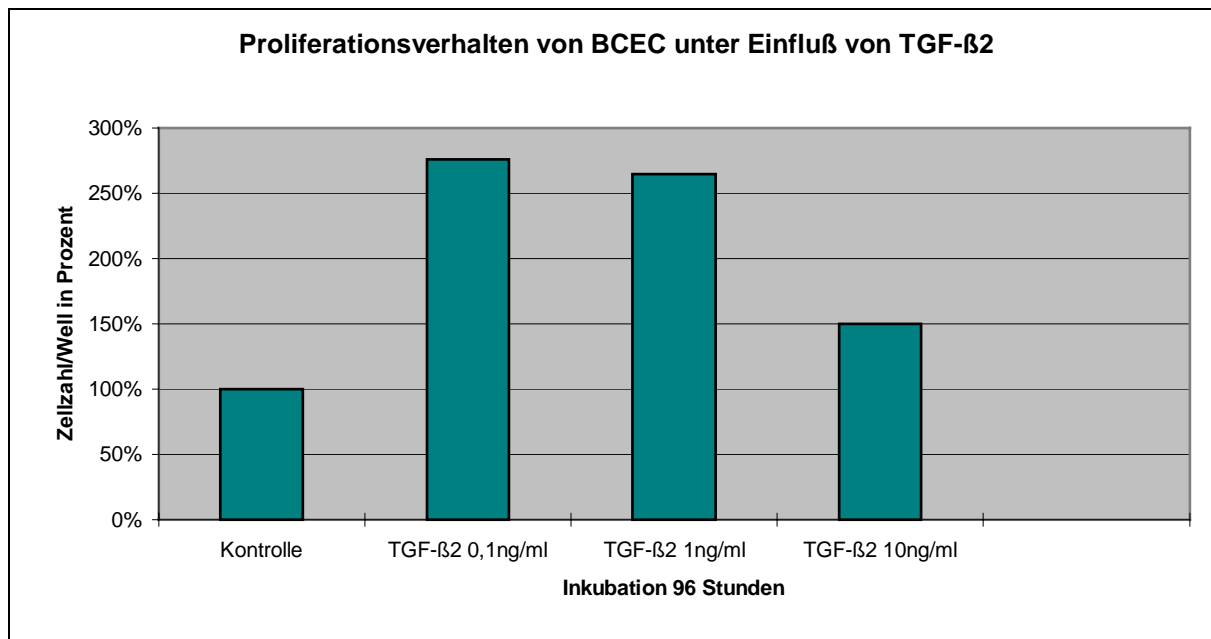


Abb. 4.6:

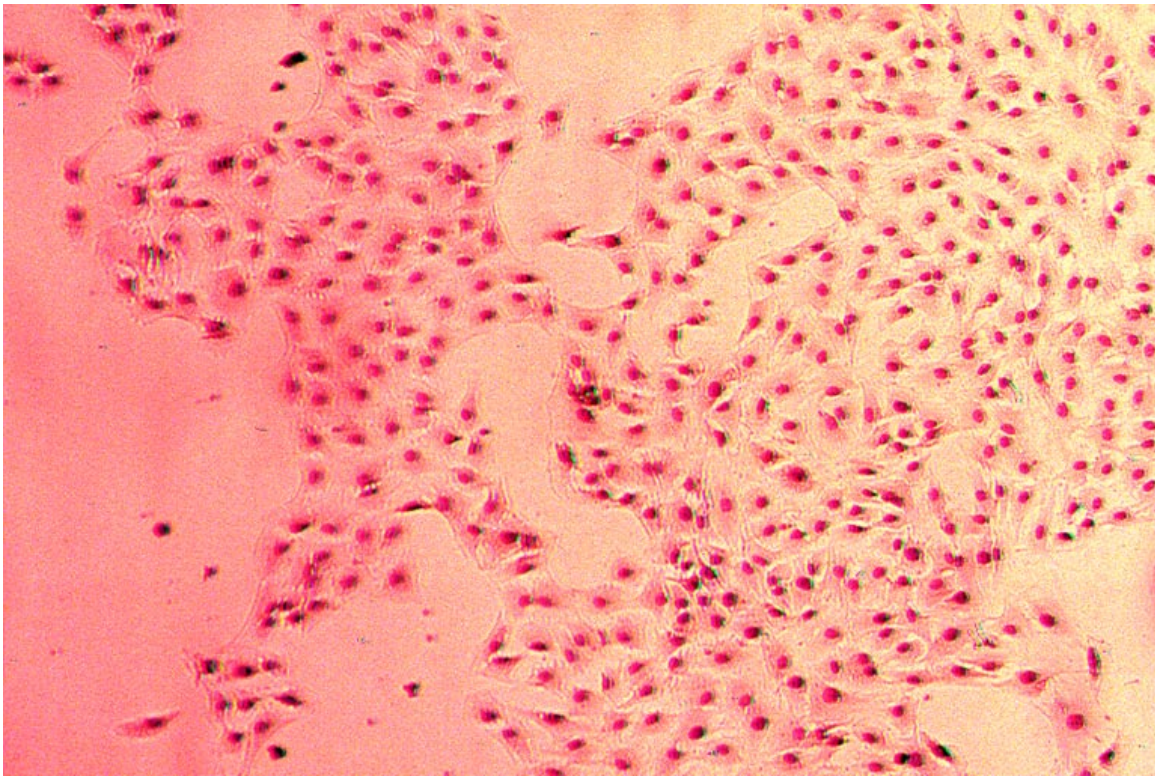


Abb. 4.7: Kontrolle

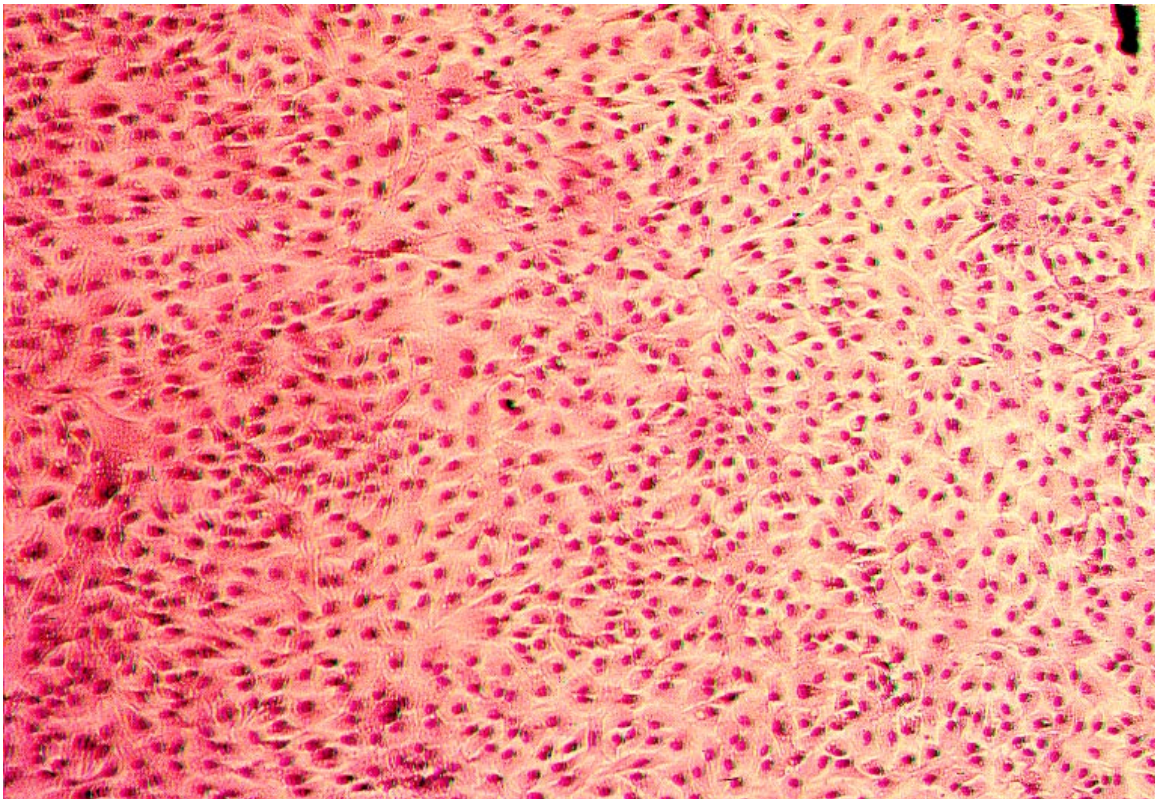


Abb. 4.8: TGF- β 2 0,1 ng / ml

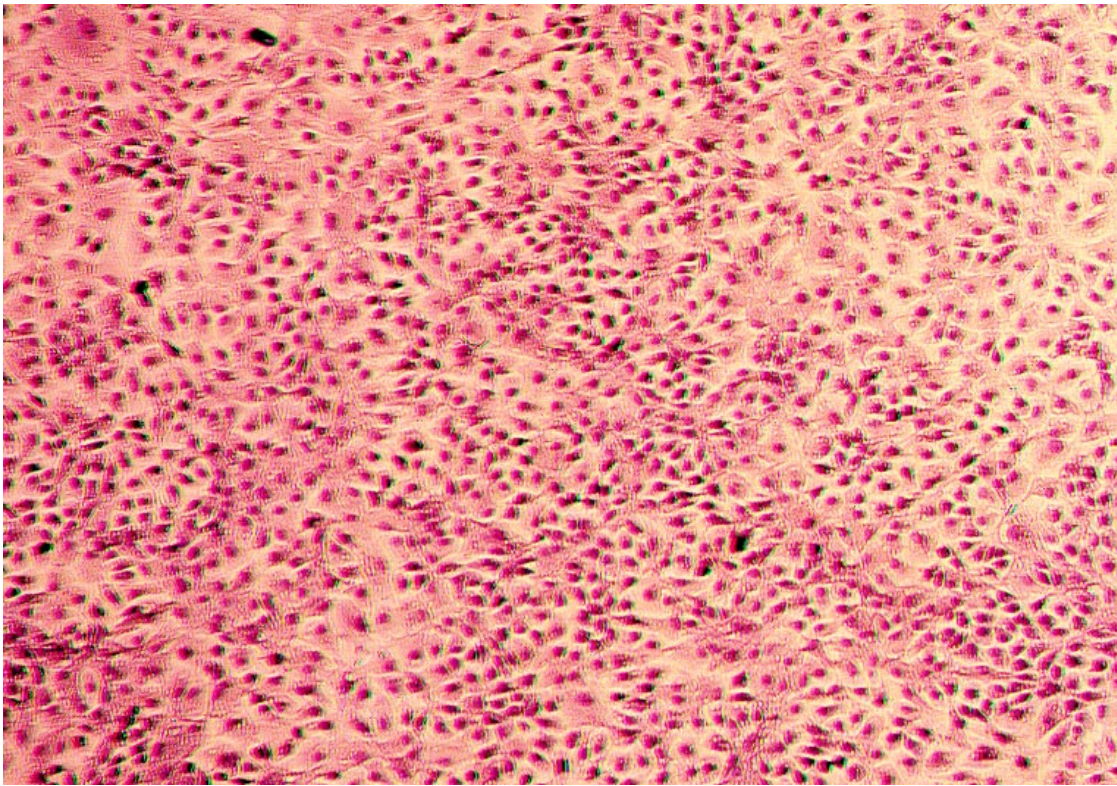


Abb. 4.9: TGF- β 2 1 ng / ml

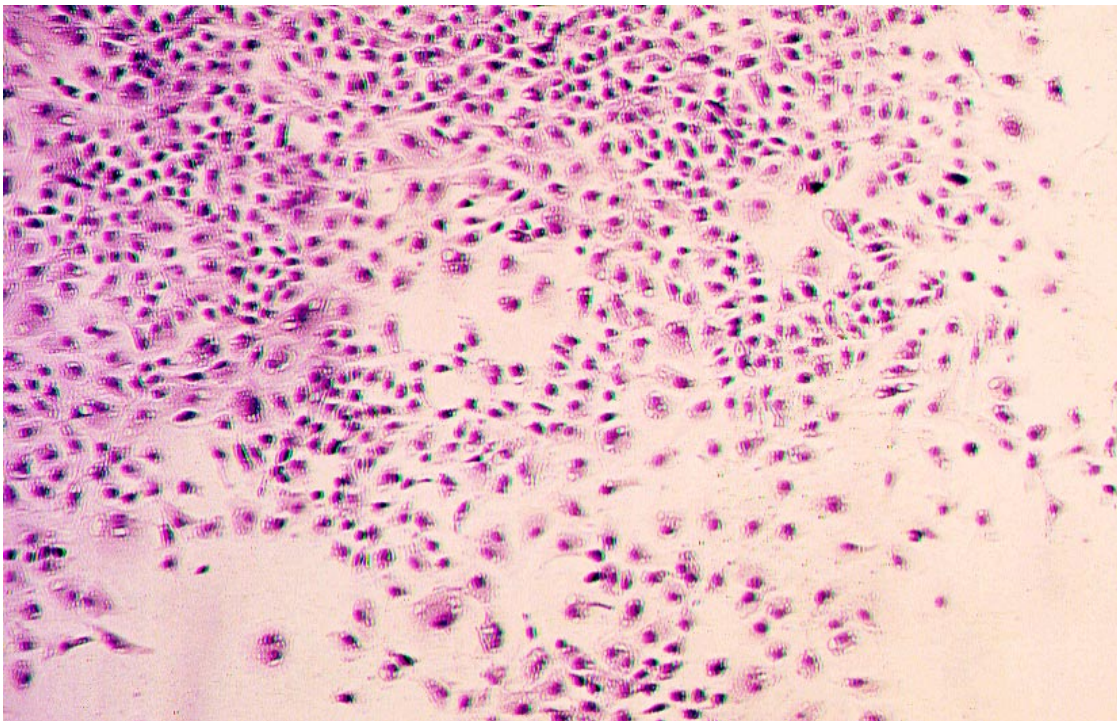


Abb. 4.10: TGF- β 2 10 ng / ml

4.2.2 Wundmodellversuche

Für die Untersuchung der Migration wurde TGF- β 2 ebenfalls in den Konzentrationen 0,1, 1 und 10 ng/ ml Kulturmedium+5% FCS zu den Zellkulturen gegeben. Im Gegensatz zur Proliferation ergab sich eine signifikante Inhibierung der Migration bei allen TGF- β 2- Konzentrationen ($p < 0,01$), wie in Abbildung 4.11. dargestellt. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen 72 h inkubiert. Die Migrationshemmung betrug jeweils ca. 50% im Vergleich zur Kontrolle. Als Kontrolle dienten Zellkulturen, die nur mit Kulturmedium+5%FCS versorgt wurden. Je ein Ausschnitt der Wundregion der Zellkulturen, die zu den in Abbildung 4.11. dargestellten Ergebnissen führten, ist in den Abb. 4.12. - 4.15. dargestellt.

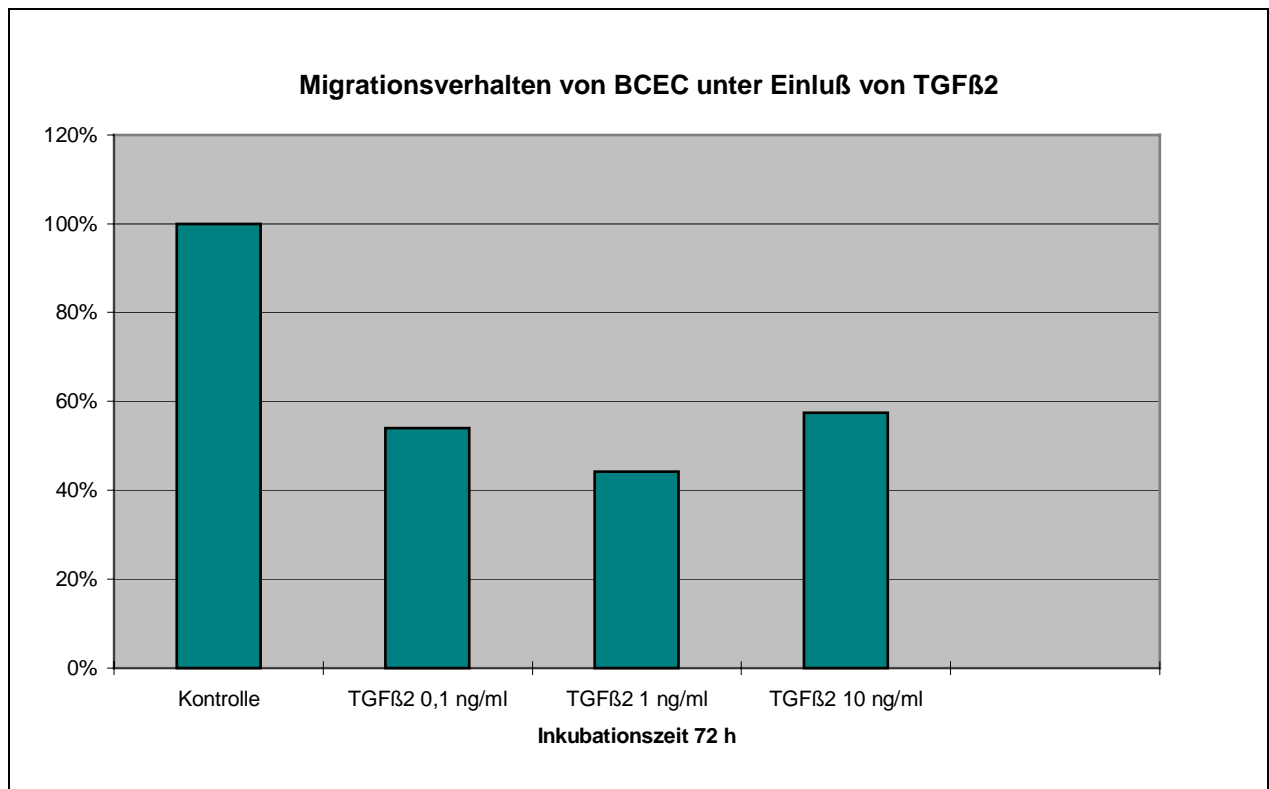


Abb. 4.11:

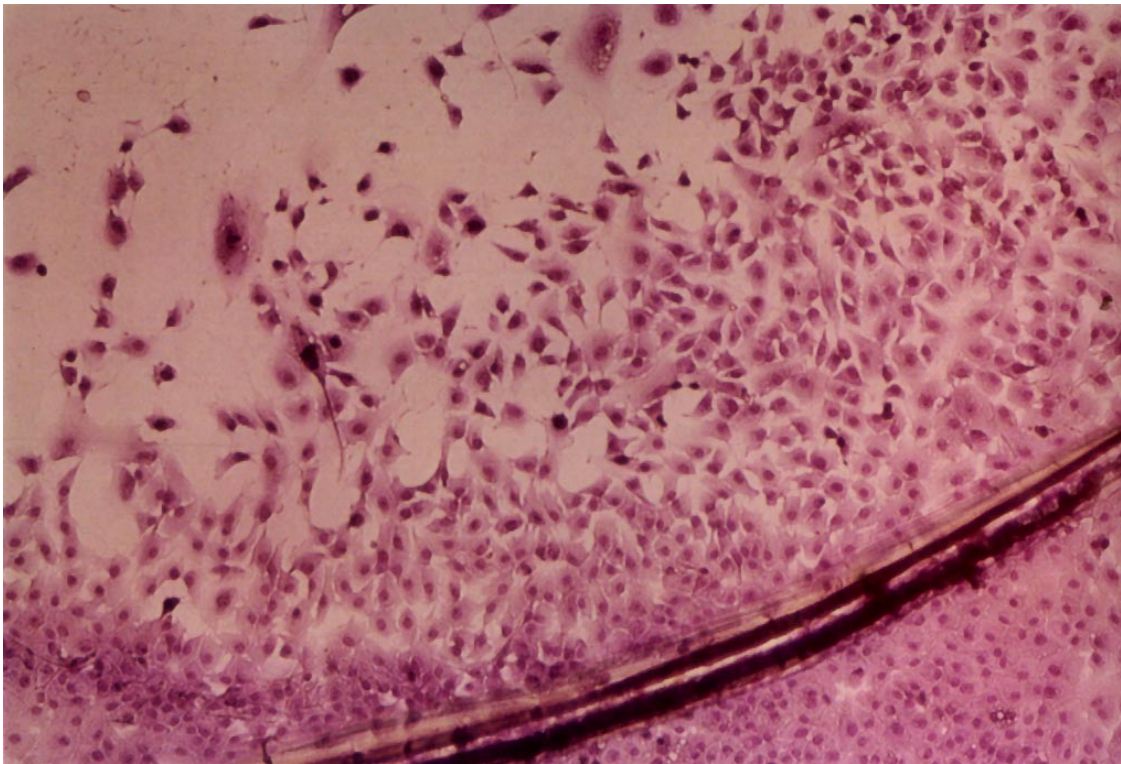


Abb. 4.12: Kontrolle

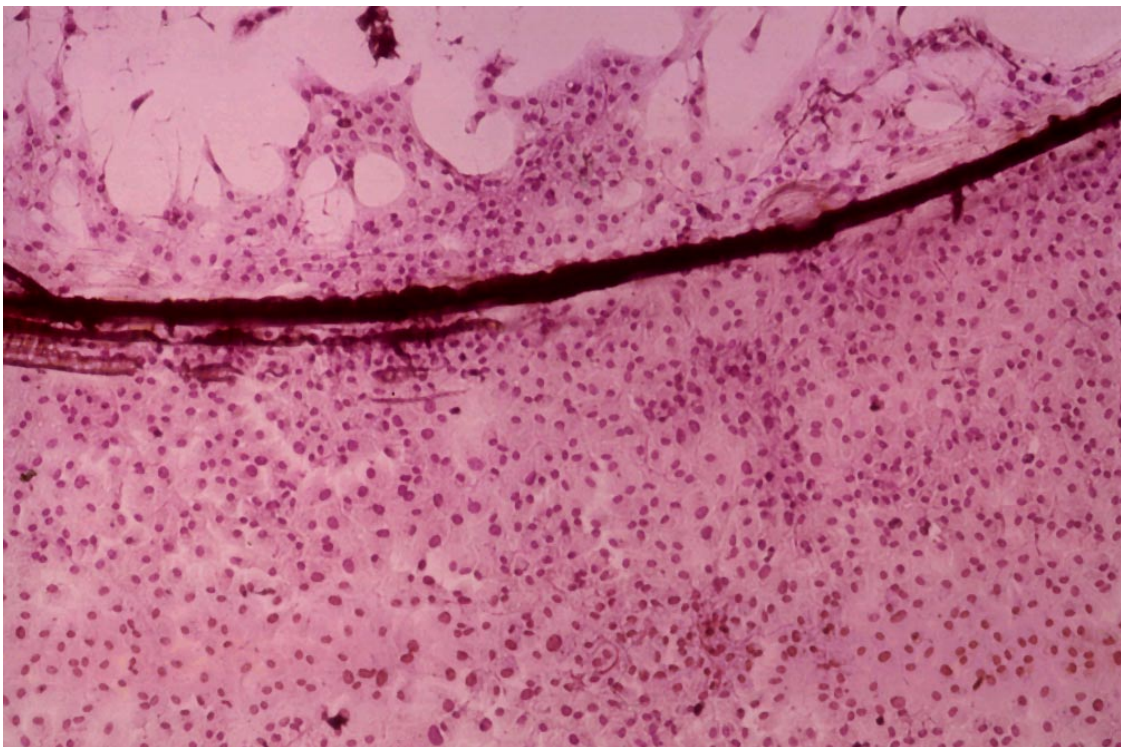


Abb. 4.13: TGF- β 2 0,1 ng / ml

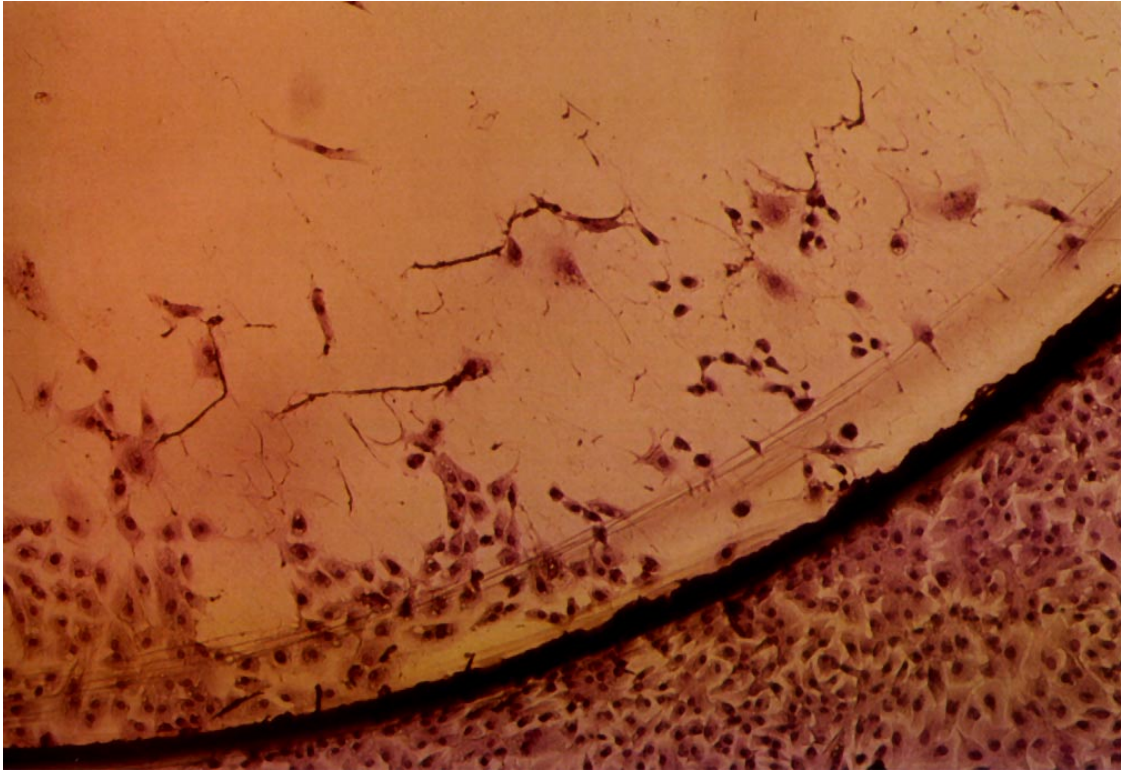


Abb. 4.14: TGF- β 2 1 ng / ml

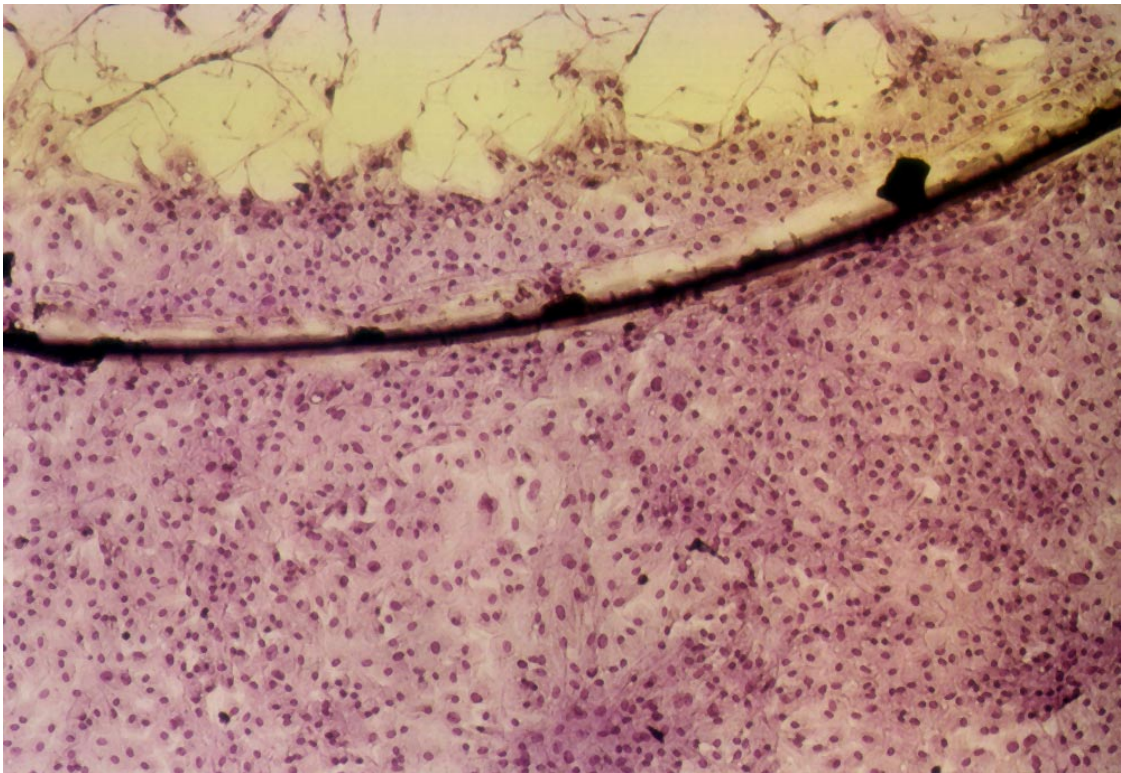


Abb. 4.15: TGF- β 2 10 ng / ml

4.2.3 Toxizitätstests

Bei Abbruch der Proliferations- und Migrationsversuche wurde Trypanblau zu den Zellkulturen gegeben. Nach Abspülen des Farbstoffes wurden die Kulturen mit reinem Ethanol fixiert. Die Ergebnisse der Toxizitätstestung wurden photodokumentiert und zwei Beispiele sind in Abb. 4.16. und 4.17. dargestellt. Die Zellkerne und das Zytoplasma sind nicht blau gefärbt. Das bedeutet, daß TGF- β 2 weder in den Proliferations - noch in den Migrationsversuchen eine toxische Wirkung auf die bovinen kornealen Endothelzellen hatte.



Abb. 4.16: Proliferation TGF- β 2 0,1 ng / ml

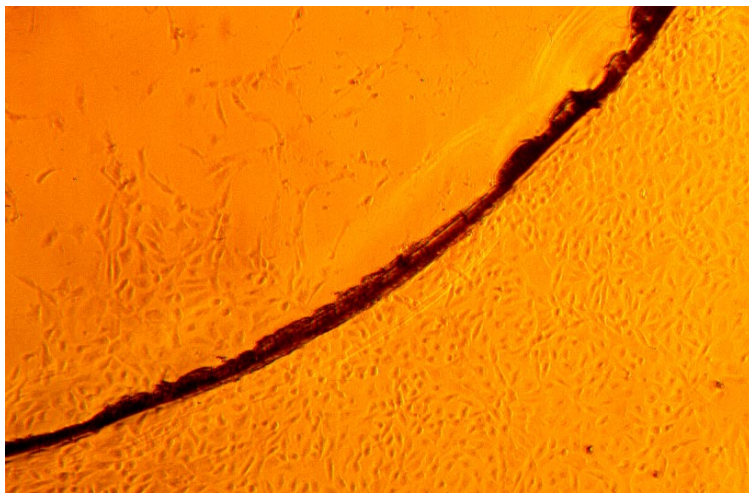


Abb. 4.17: Abb. 4.17. Migration TGF- β 2 10 ng / ml

4.3 Ascorbinsäure

4.3.1 Proliferationsversuche

Um den Einfluß auf die Proliferation der BCEC zu untersuchen, wurde L-Ascorbinsäure in drei verschiedenen Konzentrationen, und zwar 50, 100 und 200 µg/ml Kulturmedium, zu den Zellkulturen gegeben. Die verwendeten Inkubationszeiten betrugen 72 Stunden und 96 Stunden. Es wurden 3 Versuche durchgeführt. Als Kontrolle dienten jeweils Zellkulturen, die 12 Stunden nach der Aussaat der Zellen mit frischem Kulturmedium+5%FCS ohne weitere Zusätze versorgt wurden. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 4.18. dargestellt. Es ergab sich eine signifikante Inhibierung bei allen Konzentrationen und beiden Inkubationszeiten ($p < 0,004$). Die Inhibierung ist bei 200µg Ascorbinsäure/ml Medium am stärksten ausgeprägt und beträgt ca. 90 - 95% im Vergleich zur Kontrolle. Dies trifft für beide Inkubationszeiten zu. Wenn Ascorbinsäure in den Konzentrationen 50 und 100µg/ml im Medium vorhanden war, lag die Proliferationsrate nach 72 Stunden bei ca. 50%, sowie nach 96 Stunden bei ca. 70 - 80% im Vergleich zur Kontrolle. Für die Photodokumentation wurde ein vierter Versuch durchgeführt, wobei die Zellen nach abgelaufener Inkubationszeit mit absolutem Methanol fixiert und mit Giemsa gefärbt wurden (Abb. 4.19. - 4.26.).

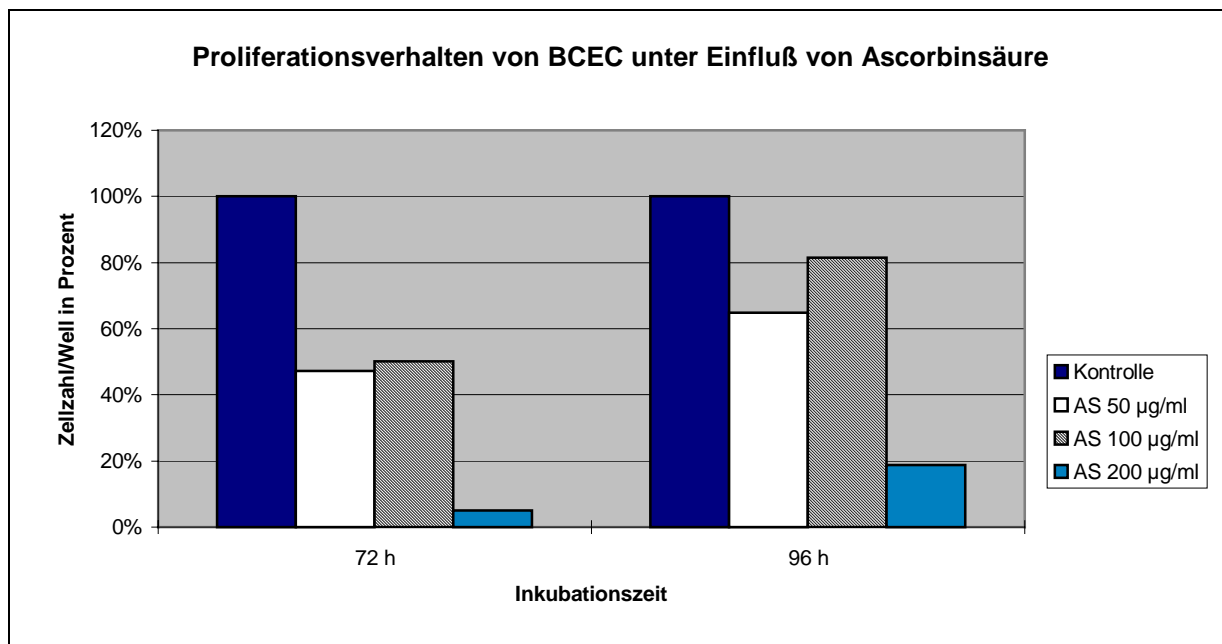


Abb. 4.18:

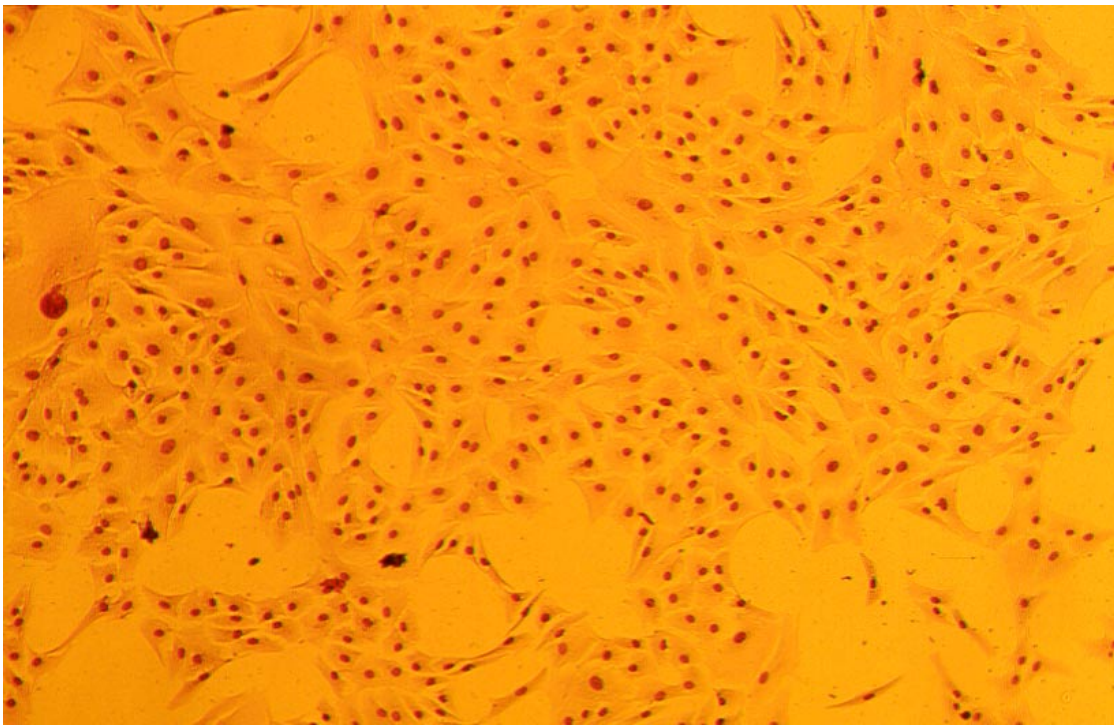


Abb. 4.19: Kontrolle Inkubation 72 h

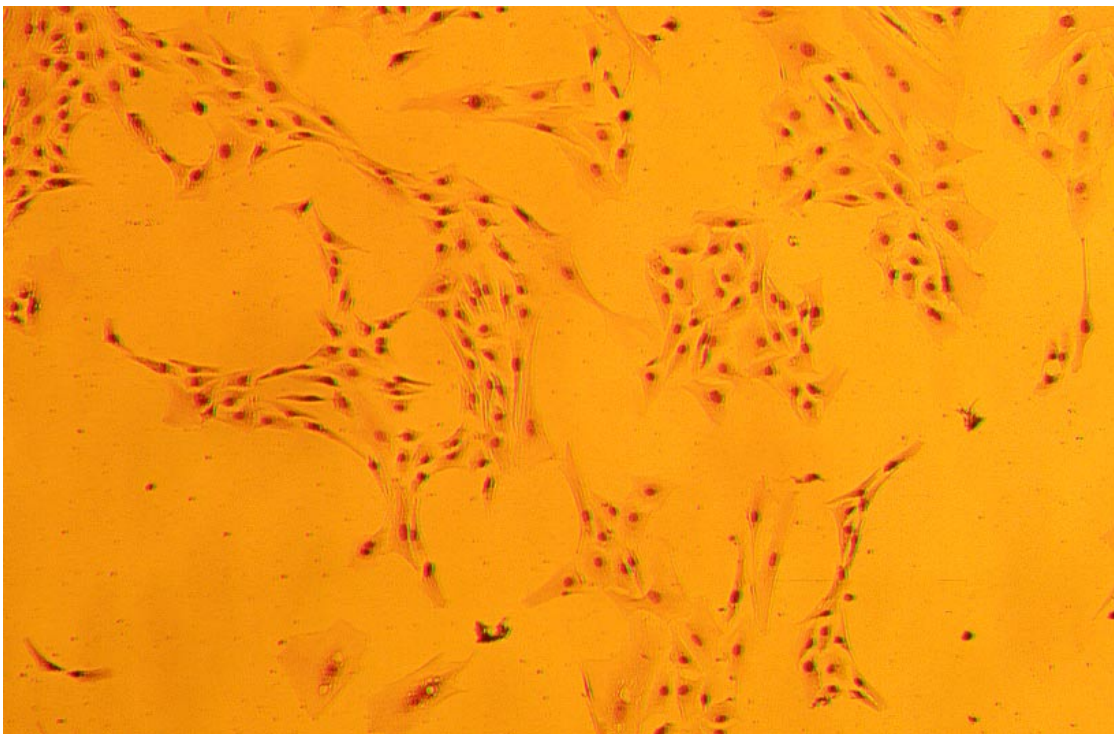


Abb. 4.20: AS 50µg / ml Inkubation 72 h

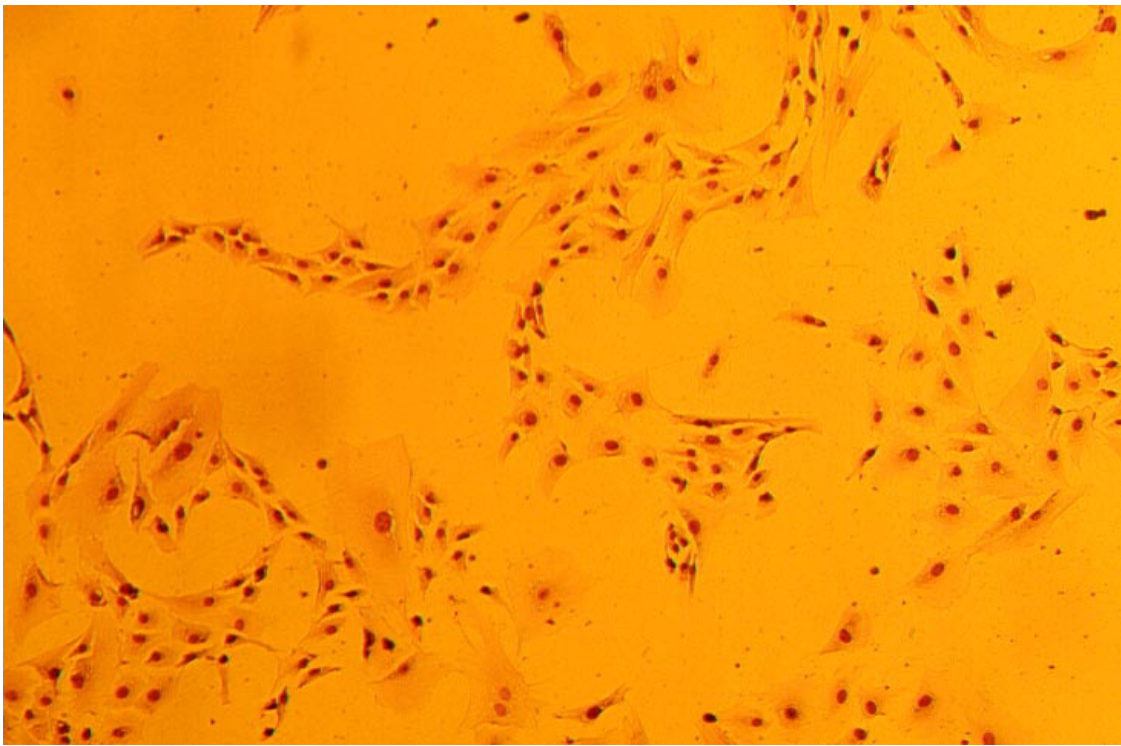


Abb. 4.21: AS 100 µg / ml Inkubation 72 h

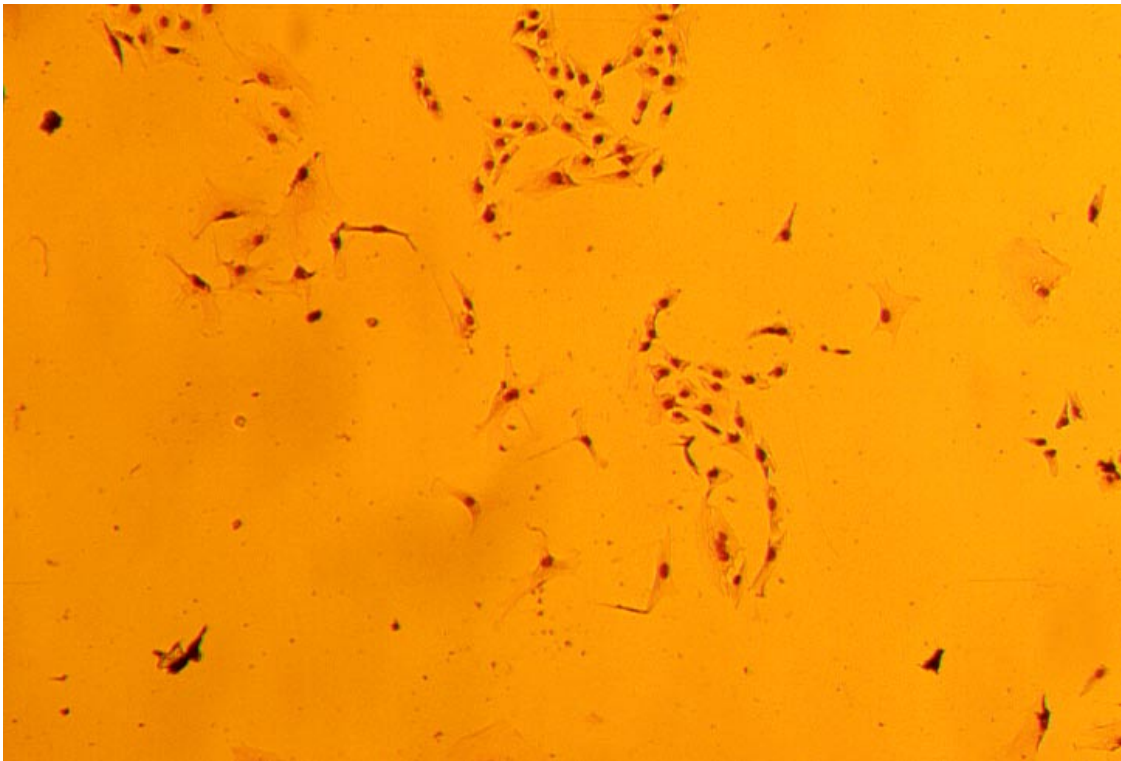


Abb. 4.22: AS 200 µg / ml Inkubation 72 h

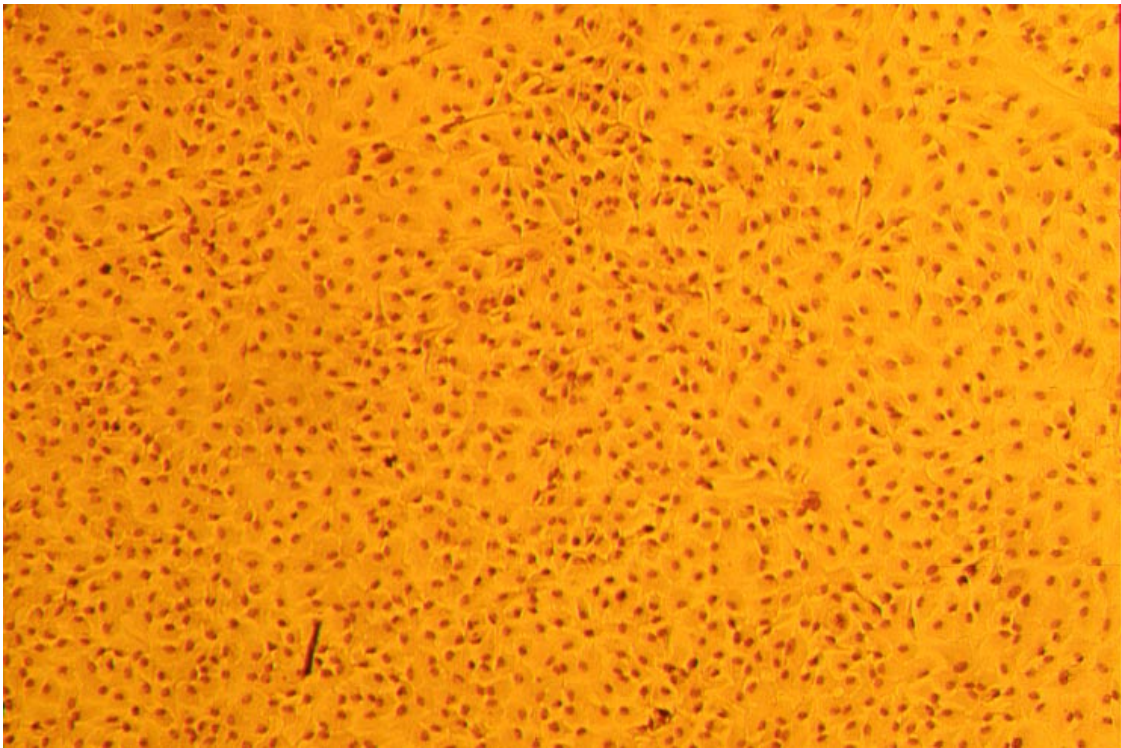


Abb. 4.23: Kontrolle Inkubation 96 h

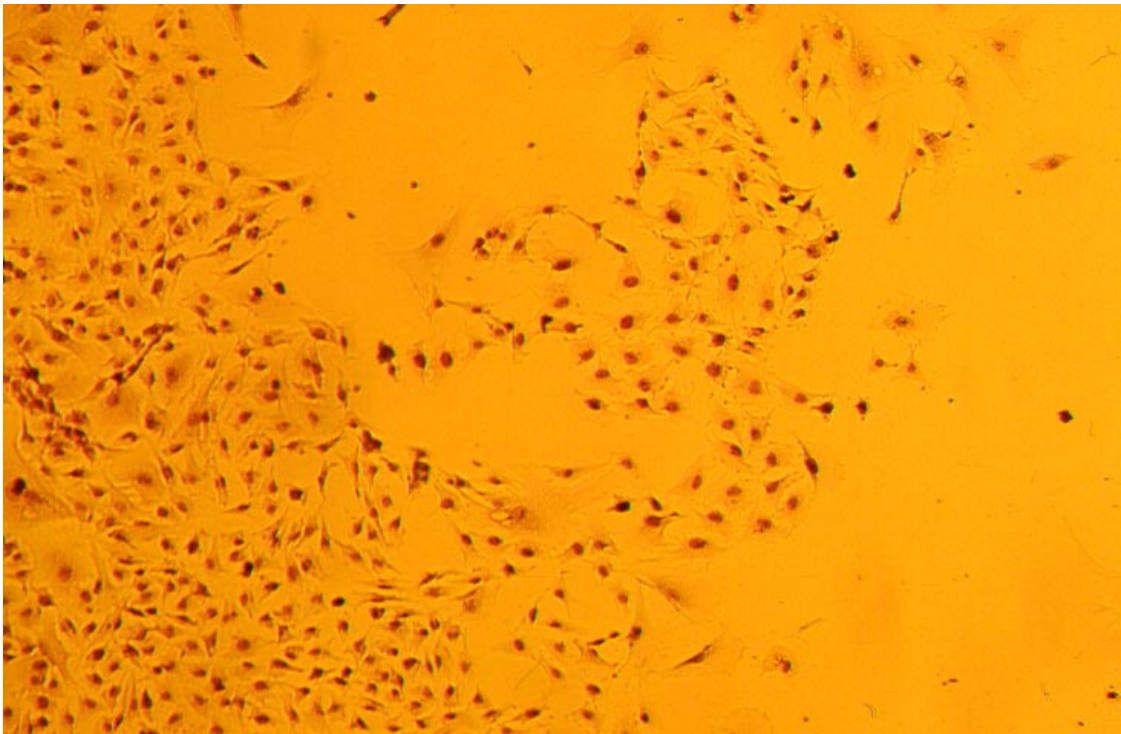


Abb. 4.24: AS 50 µg / ml Inkubation 96 h



Abb. 4.25: AS 100 μg / ml Inkubation 96 h

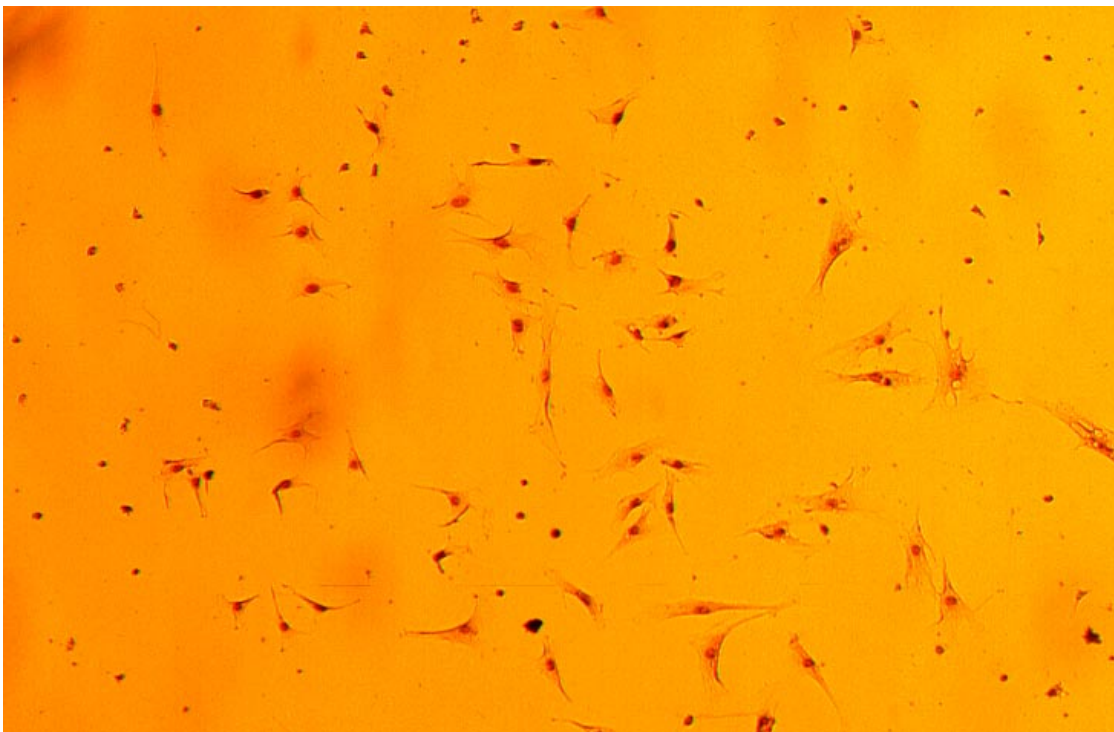


Abb. 4.26: AS 200 μg / ml Inkubation 96 h

4.3.2 Wundmodellversuche

Auch für die Untersuchung der Migration wurde Ascorbinsäure in den Konzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml Kulturmedium verwendet und nach dem Spülen der Wundläsionen zu den Zellkulturen gegeben. Als Kontrolle dienten Zellkulturen, die nach dem Spülen der Wundläsionen mit frischem Kulturmedium ohne Zusatz von Ascorbinsäure versorgt wurden. Es wurden drei Versuchsansätze durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27. dargestellt. Es zeigte sich, im Gegensatz zur Proliferation, eine signifikante Stimulation bei allen drei Konzentrationen ($p < 0,0001$). Sie war nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden ausgeprägter als nach 72 Stunden Inkubation. Die Ergebnisse aus Abbildung 4.27. sind mit je einem Ausschnitt in Abb. 4.28. - 4.35. dargestellt.

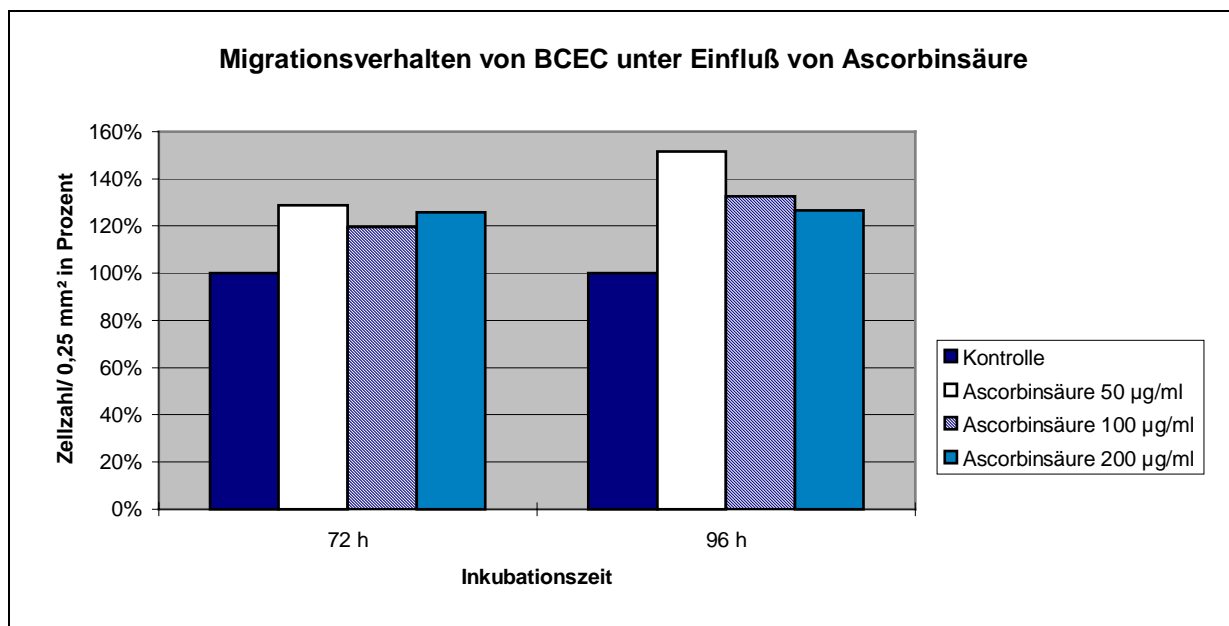


Abb. 4.27

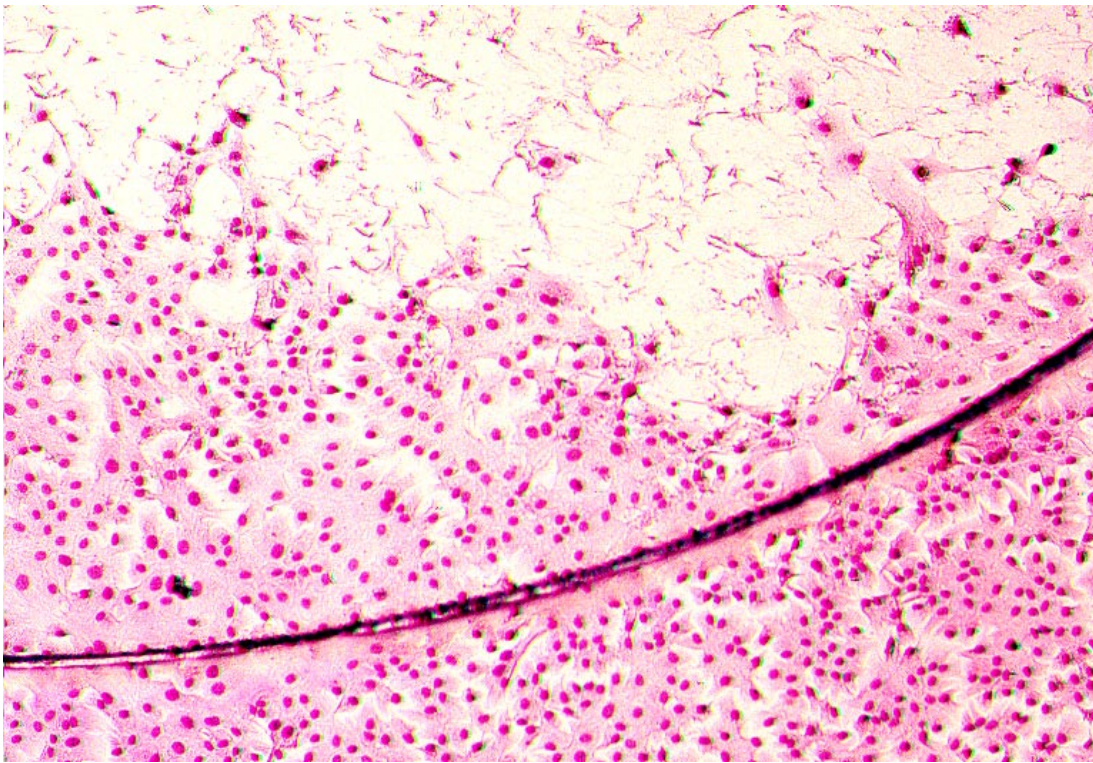


Abb. 4.28: Kontrolle Inkubation 72 h

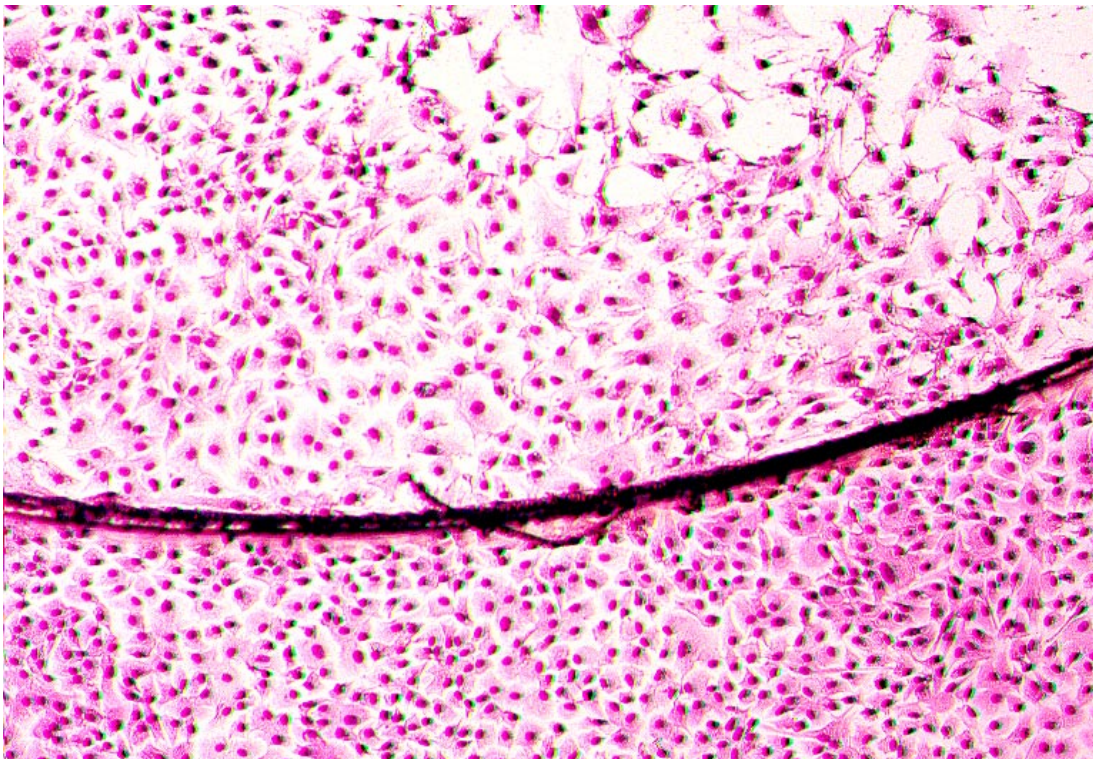


Abb. 4.29: AS 50 µg / ml Inkubation 72 h

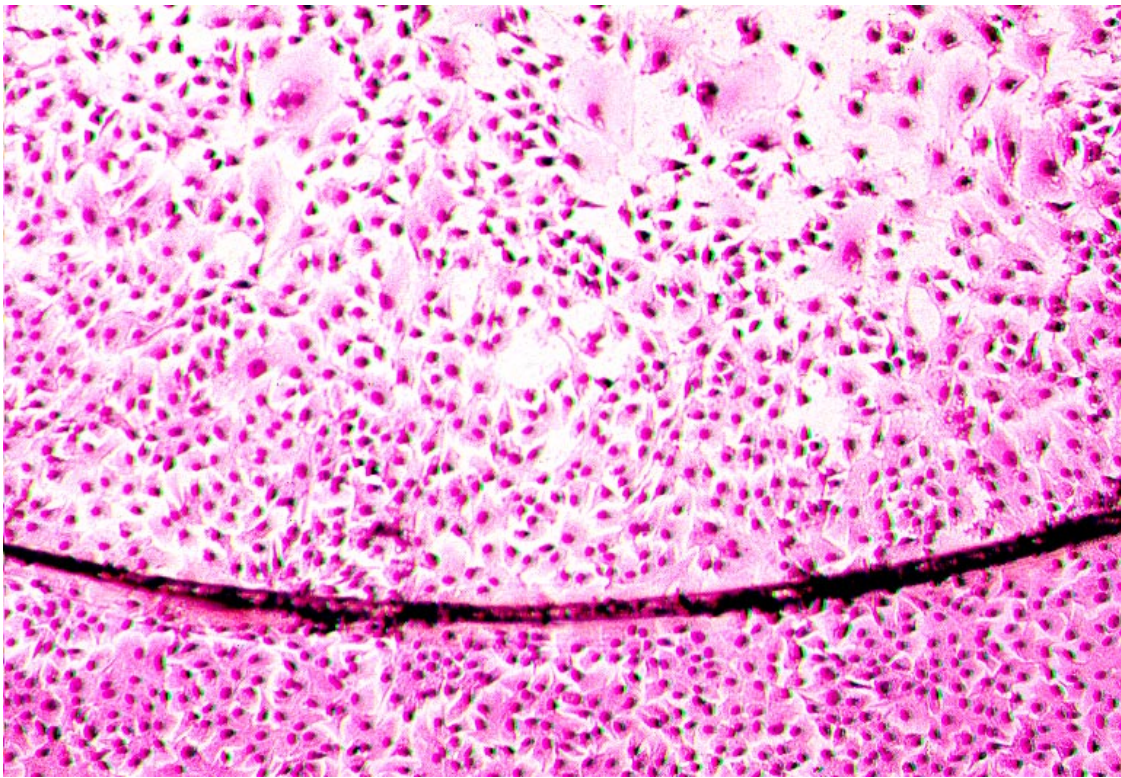


Abb. 4.30: AS 100 µg / ml Inkubation 72 h

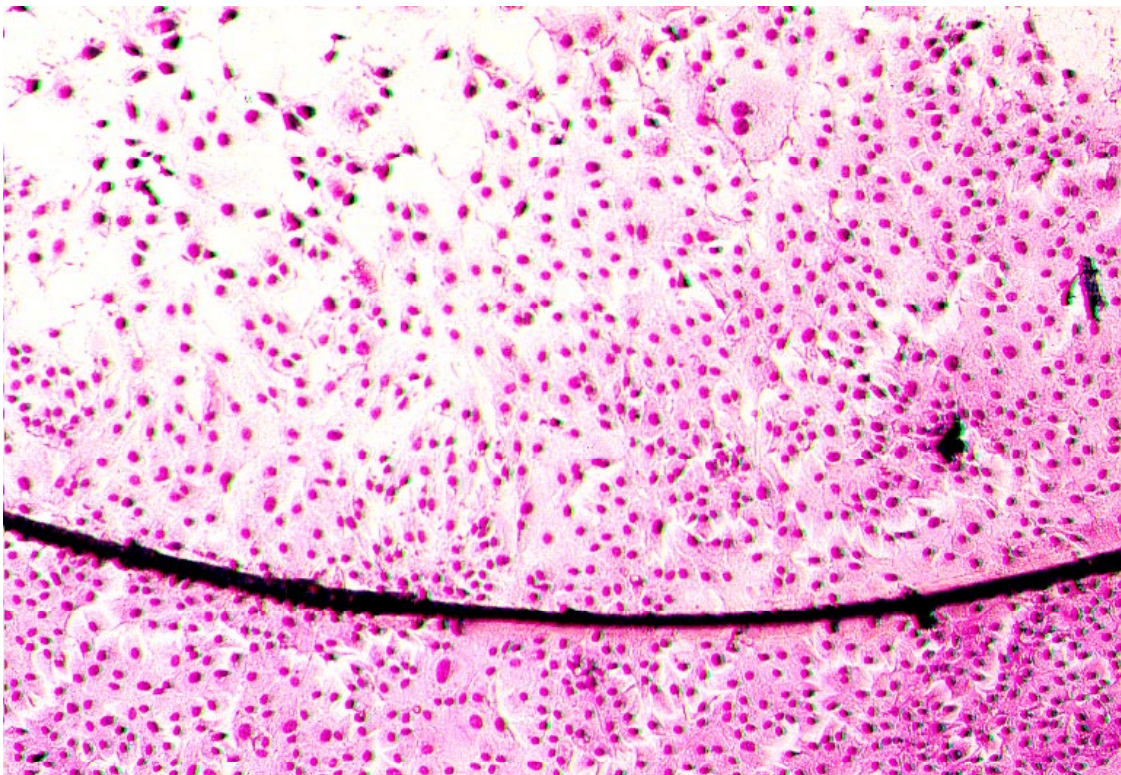


Abb. 4.31: AS 200 µg / ml Inkubation 72 h

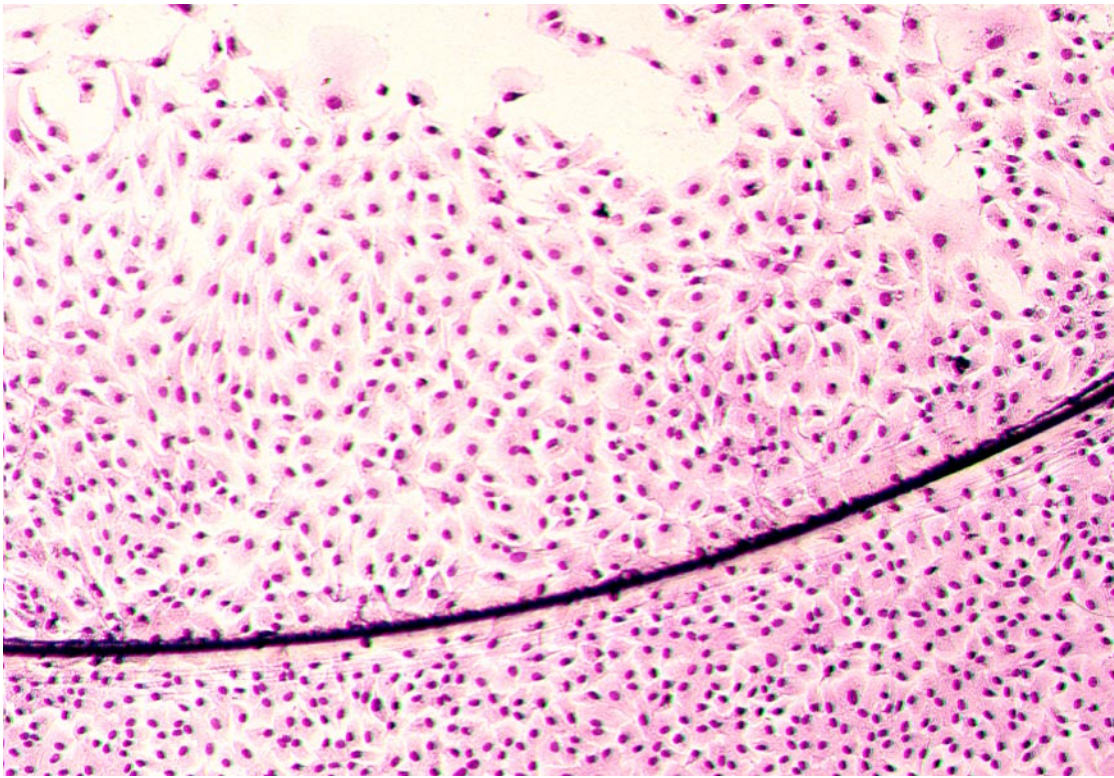


Abb. 4.32: Kontrolle Inkubation 96 h

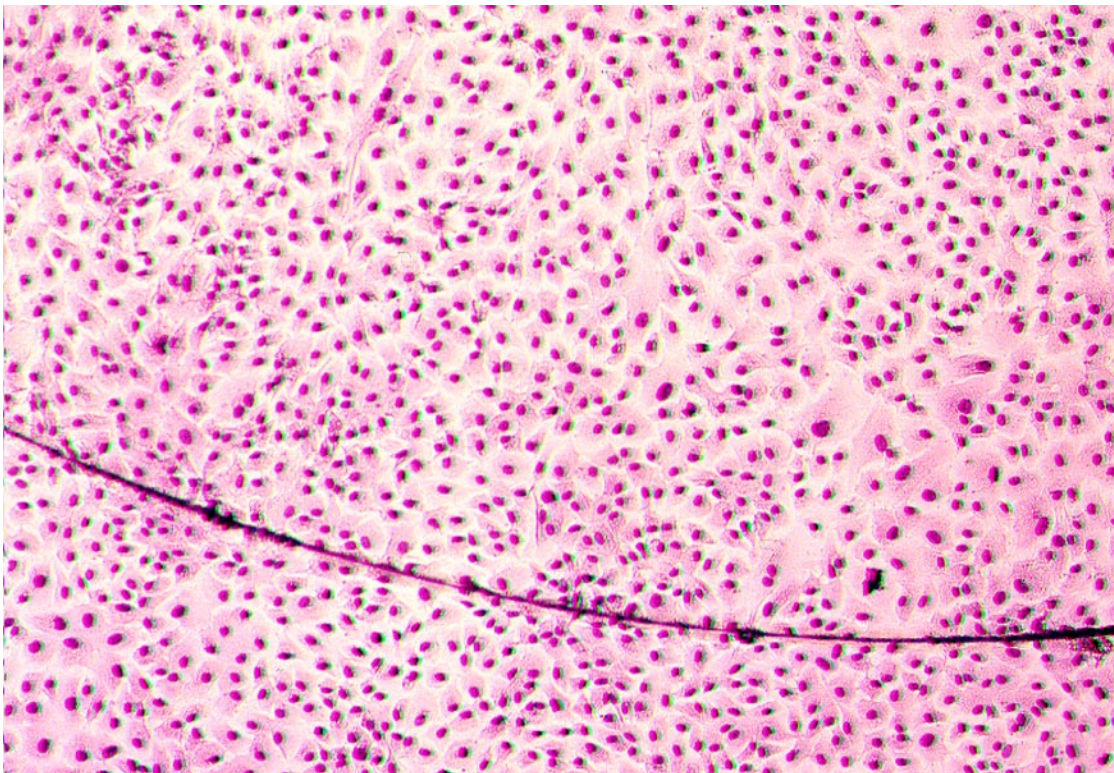


Abb. 4.33: AS 50 $\mu\text{g} / \text{m}$ Inkubation 96 h

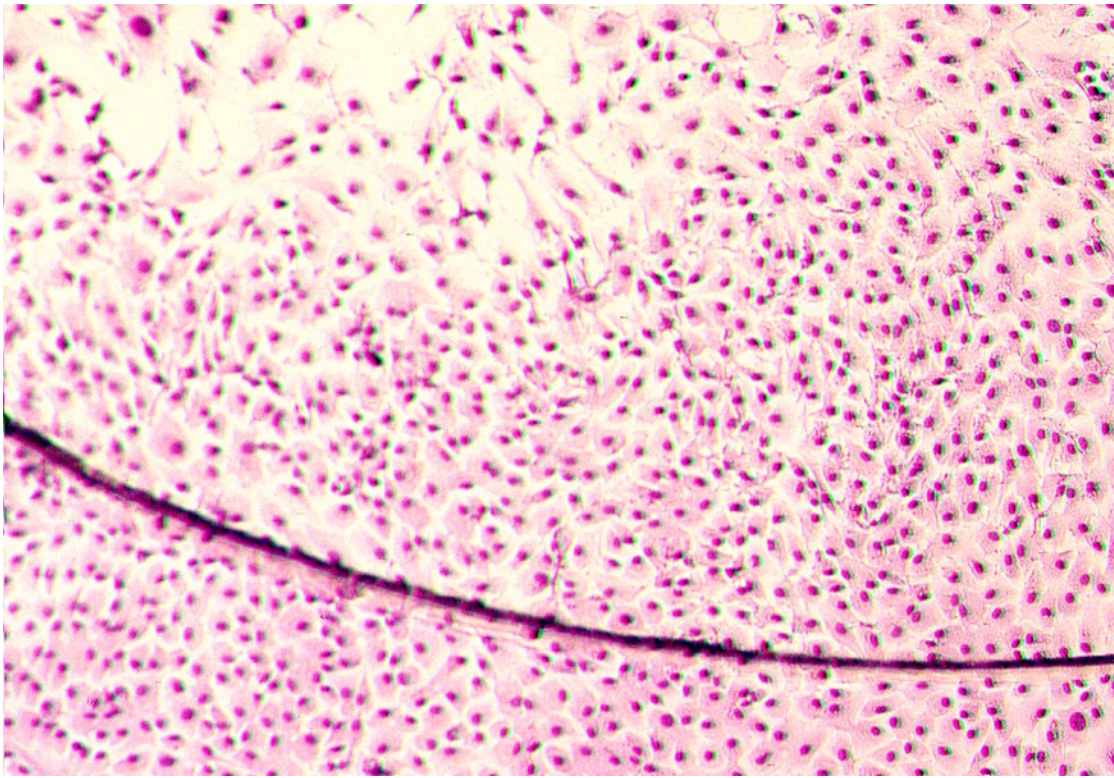


Abb. 4.34: AS 100 µg / ml Inkubation 96 h

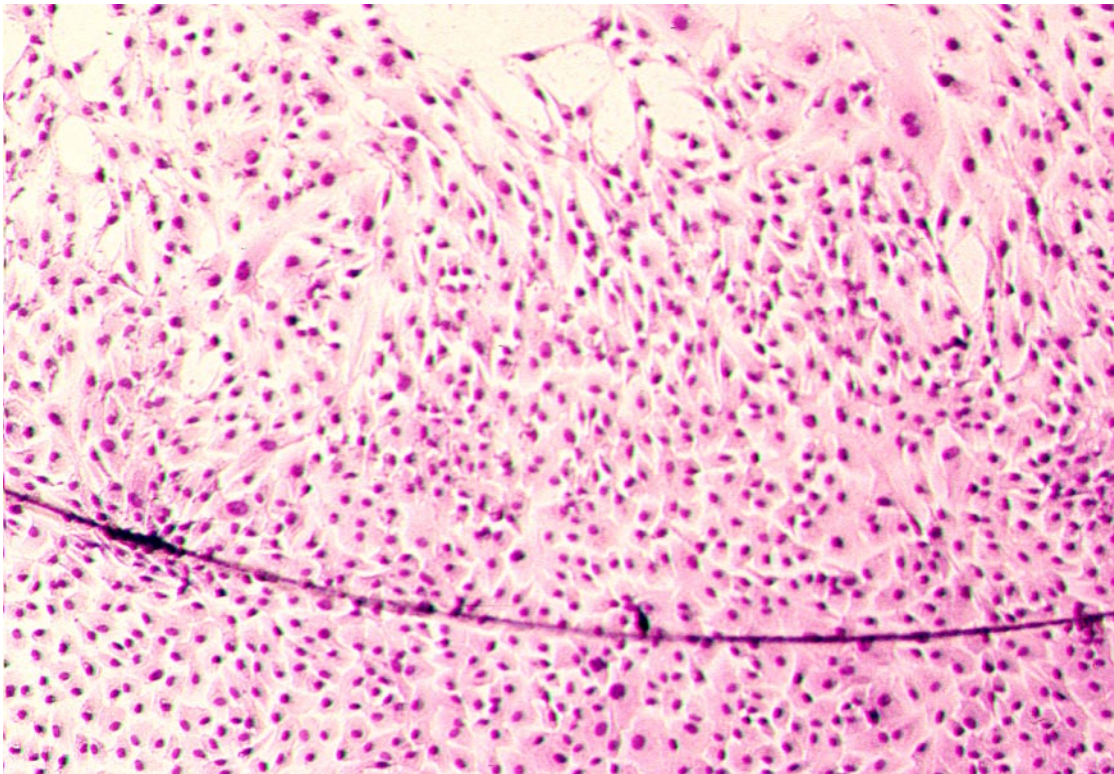


Abb. 4.35: AS 200 µg / ml Inkubation 96 h

4.3.3 Toxizitätstests

Auch bei den Proliferations- und Migrationsversuchen mit Ascorbinsäure wurden Vitalitätsprüfungen durchgeführt. Trypanblau wurde nach Abbruch der Versuche zu den Zellkulturen gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 1 min wurde der Farbstoff abgespült und die Zellkulturen mit Ethanol fixiert. Ascorbinsäure hat in den verwendeten Konzentrationen keine toxische Wirkung auf die Proliferation und Migration der bovinen kornealen Endothelzellen. Die Zellkerne und das Zytoplasma sind nicht blau angefärbt. Einige Beispiele der Photodokumentation sind in Abb. 4.36. - 4.40. dargestellt.



Abb. 4.36: Migration Kontrolle Inkubation 96 h



Abb. 4.37: Migration AS 200 µg / ml Inkubation 96 h

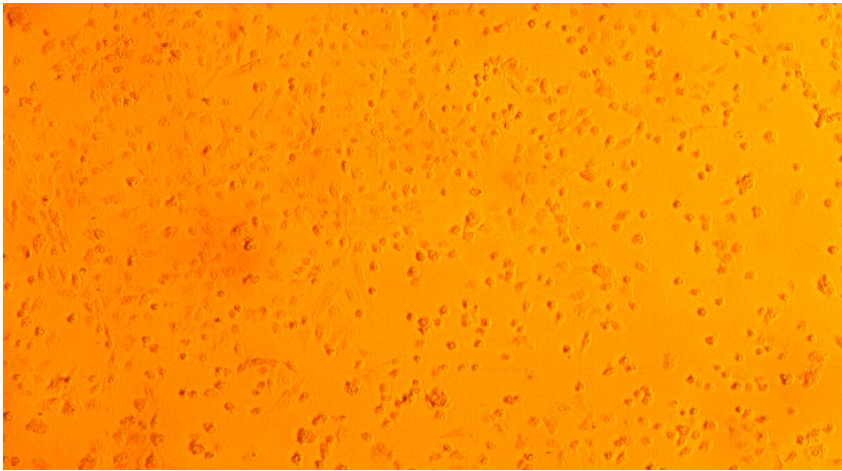


Abb. 4.38: Proliferation Kontrolle Inkubation 72 h

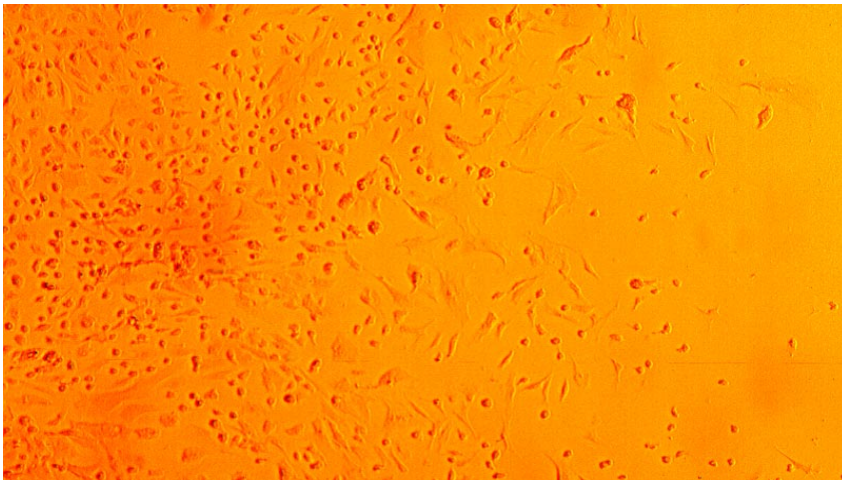


Abb. 4.39: Proliferation AS 100 µg / ml Inkubation 96 h

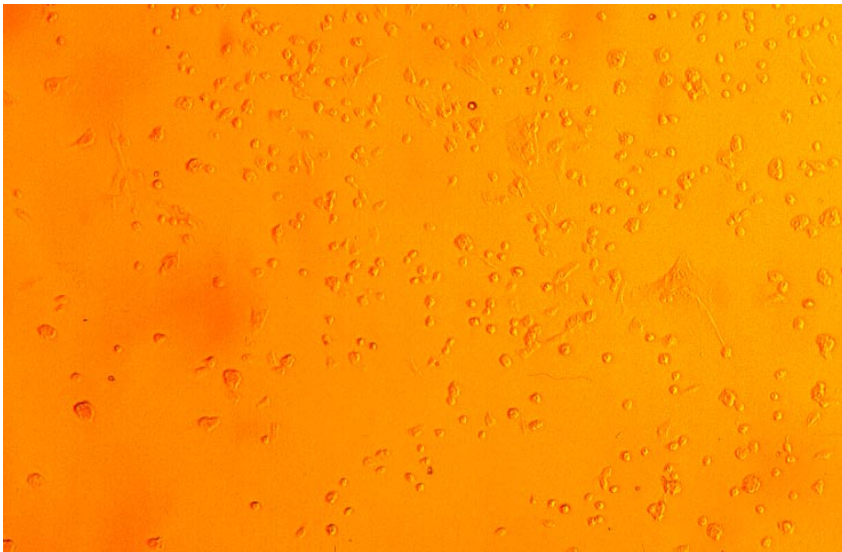


Abb. 4.40: Proliferation AS 200 µg / ml Inkubation 72 h

4.3.4 Beeinflussung der Wirkung von Ascorbinsäure auf die Proliferation von BCEC durch 12-S-HETE

Bei diesem Versuch wurde 12-S-HETE in der Konzentration 0,1 μM zum Medium gegeben, das Ascorbinsäure in der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ enthielt. Als Kontrolle dienten Zellkulturen, die mit Medium inkubiert wurden, das weder Ascorbinsäure noch 12-S-HETE enthielt. Die Inkubationszeit betrug 96 Stunden. Das Medium wurde nach der Hälfte der Inkubationszeit erneuert, da 12-S-HETE eine sehr geringe Halbwertszeit besitzt.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 4.41. dargestellt. Die Hemmung durch Ascorbinsäure konnte durch 12-S-HETE in der Konzentration 0,1 μM partiell aufgehoben werden (Hemmung durch Ascorbinsäure: ca. 70%, Verminderung der Hemmung durch 12-S-HETE 0,1 μM auf ca. 50%).

Es wurde ein Versuchsansatz mit je 5 Wells/Konzentration durchgeführt. Es ergab sich eine Signifikanz der 12-S-HETE-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle sowie im Vergleich zur alleinigen Ascorbinsäure - Zugabe ($p < 0,006$).

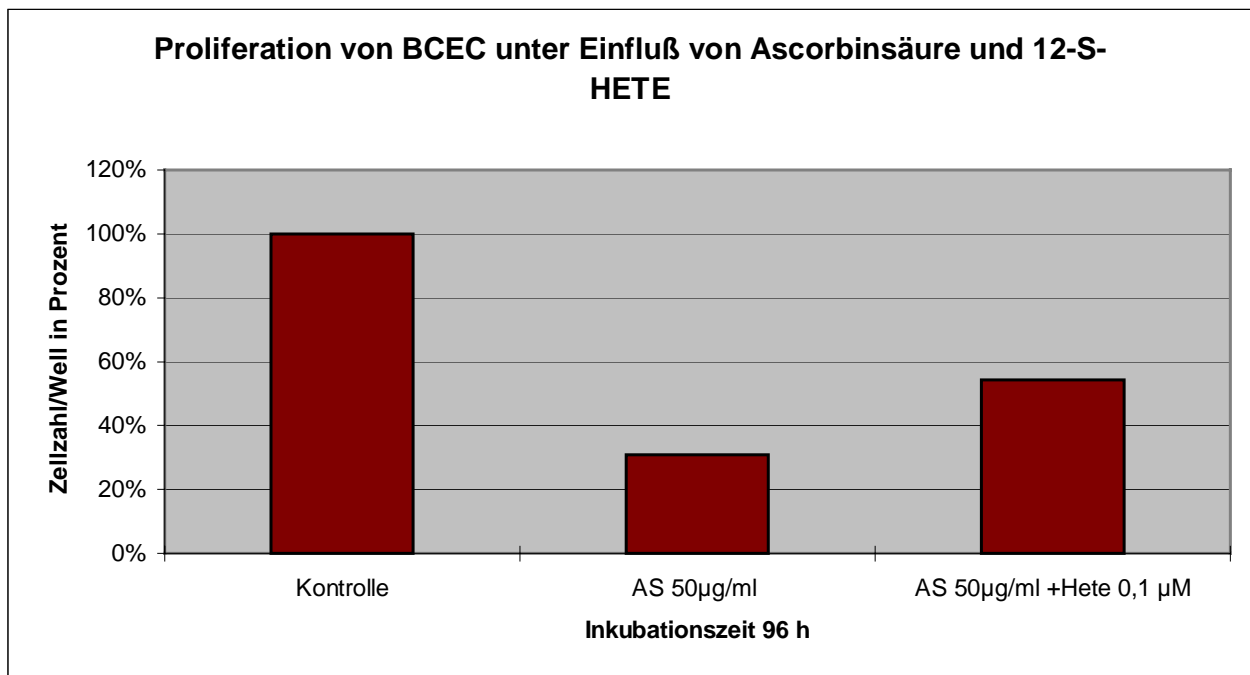


Abb. 4.41

5 Diskussion

5.1 Humanes Kammerwasser

Sowohl die Proliferation als auch die Migration boviner kornealer Endothelzellen in Zellkultur wurde unter Einfluß von humanem Kammerwasser gehemmt. Die Experimente wurden mit unverdünntem und 10%igem humanem Kammerwasser durchgeführt. Es ergab sich eine nahezu vollständige Hemmung von Proliferation und Migration unter Einwirkung von unverdünntem Kammerwasser. Die Proliferations- und Migrationsrate betrug 70% der Kontrollzellkulturen, wenn dem Medium 10% Kammerwasser zugesetzt wurde.

In dieser Studie wurde primäres (normales) Kammerwasser verwendet, das während Routine - Kataraktextraktionen entnommen wurde. Postoperativ, sowie durch verschiedene Erkrankungen, kann sich die Zusammensetzung des Kammerwassers verändern (sekundäres Kammerwasser). So kann es zu einem erhöhten Gehalt an Serum - Makromolekülen (Weinsieder et al. 1975), Insulin (Coulter et al. 1980) und Prostaglandinen (Eakins et al. 1972) kommen. Es ist bekannt, daß diese Moleküle die Zellteilung beeinflussen (Barnes und Sato 1980).

Die Wirkung von Kammerwasser auf die Proliferation okulärer Zellen wurde schon vielfach untersucht, wohingegen in dieser Studie erstmalig am Wundmodell der hemmende Einfluß von Kammerwasser auf die Migration gezeigt wurde.

Primäres Kammerwasser hat einen hemmenden Einfluß auf die Proliferation von Thymozyten (Granstein et al. 1990) und Lymphozyten (Kaiser et al. 1989), stimuliert jedoch die Proliferation von Fibroblasten (Burke et al. 1982/83).

Bei Verwendung von sekundärem Kammerwasser des Kaninchens konnte eine fördernde Wirkung auf die Proliferation von Kaninchen - Linsenepithelzellen (Reddan et al. 1979) und bovinen kornealen Endothelzellen (Ledbetter et al. 1983) beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser publizierten Studien sind schwierig zu vergleichen, da die Versuchsbedingungen stark variieren (Konzentrationen, primäres oder sekundäres Kammerwasser, unterschiedliche Spezies). Weiterhin wurden zum Teil qualitative

Beobachtungen der Kulturmorphologie zur Beurteilung des Wachstums benutzt. In anderen Studien dient die Zellzahl als Maß für die Proliferationsrate.

Welche Faktoren im primären oder sekundären Kammerwasser für eine Stimulation oder Inhibierung des Wachstums kornealer Endothelzellen verantwortlich sind, ist nach wie vor unbekannt.

5.2 Der Transforming Growth Factor Beta 2 (TGF- β 2)

Die Untersuchung des Einflusses von TGF- β 2 auf die Proliferation und Migration boviner kornealer Endothelzellen in Zellkultur ergab einen gegensätzlichen Effekt. Die Proliferation wurde dabei bis auf den dreifachen Wert der Kontrollzellkulturen stimuliert, wohingegen die Migration sowohl bei der physiologischen Konzentration (1-3 ng/ml) als auch bei Konzentrationen von 0,1 und 10 ng/ml zu 50% inhibiert wurde.

Die biologischen Wirkungen der TGF- β s sind sehr vielfältig und reichen von der Regulation der Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration von Zellen über eine Stimulation von extrazellulärer Matrix - Sezernierung bis zu einer Modulation vieler Entzündungs - und Immunprozesse. TGF- β spielt *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Gewebserneuerung, Wundheilung und der Morphogenese während der embryologischen Entwicklung (Roberts und Sporn 1990).

Die Wirkungen von TGF- β auf das Zellwachstum wurden bereits vielfach untersucht, wobei sich sowohl inhibierende als auch stimulierende Effekte gezeigt haben. Es wird angenommen, daß TGF- β seine inhibitorische Wirkung dadurch entfaltet, daß es die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus verharren läßt und damit den Eintritt in die S - Phase verzögert (Studie an vaskulären Endothelzellen, Heimark et al. 1986).

Der Einfluß von TGF- β 2 auf die Proliferation wurde schon an zwei verschiedenen okulären Zellarten studiert, wobei sich ein gegensätzlicher Effekt zeigte. So wurde die Proliferation boviner kultivierter Linsenepithelzellen durch TGF- β 2 signifikant inhibiert (Kurosaka und Nagamoto 1994). In derselben Studie wurde der stimulierende Effekt von 10% humanem Kammerwasser im Medium durch Zugabe eines anti-TGF- β 2 Antikörpers aufgehoben. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß der im Kammerwasser enthaltene TGF- β 2 die Proliferation von Linsenepithelzellen *in vitro*

hemmt. Einen zu diesen Ergebnissen gegensätzlichen Effekt hat TGF- β 2 auf die Proliferation von kornealen Stromafibroblasten (Kay et al. 1997). In dieser Studie wurde der Einfluß von TGF- β 1, 2 und 3 untersucht und eine signifikante Stimulierung der Proliferation durch alle drei Isoformen gezeigt. Es liegen keine Studien zum Einfluß von TGF- β 2 auf korneale Endothelzellen vor. Rieck et al. konnten keine signifikante Stimulation der Proliferation humaner kornealer Endothelzellen in Zellkultur durch TGF- β 1 nachweisen (Rieck et al. 1995).

Nach meinem Wissensstand wurde der Einfluß von TGF- β 2 auf die Migration okulärer Zellen bisher nicht untersucht. In einer Studie von Sankar et al. wird ein hemmender Effekt von TGF- β 2 auf die Migration boviner Aortenendothelzellen beschrieben (Sankar et al. 1995).

Studien an den genetisch besser zugänglichen Spezies *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* haben das Verständnis darüber, wie die Signaltransduktion von Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren (z.B. TGF- β -Rezeptor I und II) zum Kern abläuft, entscheidend verbessert. In *Drosophila* wurden TGF- β -ähnliche Proteine, genannt *Mad* (*mothers against dpp*), identifiziert (Sekelsky et al. 1995) und in *Caenorhabditis elegans*, *Mad* - Homologe, die Sma2, Sma3 und Sma4 genannt wurden (Savage et al. 1996). In *Xenopus*, Maus und Mensch wurden bis zu neun Homologe zu *Mad* und Sma gefunden, die intrazelluläre Komponenten in der Signaltransduktion der TGF- β s darstellen. Sie werden SMADs genannt (Derynck et al. 1996).

Eine Studie mit radiomarkiertem TGF- β 1 von Yamashita et al. läßt darauf schließen, daß der bei Bindung von TGF- β an den TGF- β -Rezeptor II (T β RII) ausgebildete Rezeptorkomplex ein Heterotetramer darstellt, welcher aus zwei TGF- β -Rezeptor I (T β RI) und zwei T β RII-Molekülen besteht (Yamashita et al. 1994). T β R I und II sind strukturell ähnlich. Sie besitzen eine kleine cysteinreiche extrazelluläre Region und einen intrazellulären Teil, der hauptsächlich aus der Kinasedomäne besteht. Der T β R I, aber nicht der T β R II, hat eine Region, die reich an Glycin- und Serinresten (GS-Domäne) in der juxtamembranären Domäne ist (Heldin et al. 1997). An dieser GS-Domäne wird T β R I von T β RII durch Phosphorylierung aktiviert (Wrana et al. 1994; Souchelnytskyi et al. 1996). Durch den aktivierten Rezeptorkomplex werden die intrazellulären Smad 2 und 3 Proteine ebenfalls phosphoryliert und bilden anschließend

einen Komplex mit Smad 4 (Nakao et al. 1997). Dieser Komplex wandert vom Zytoplasma in den Zellkern und bildet dort mit intranuklearen Faktoren einen Komplex, der daraufhin eine Gentranskription initiiert (Heldin et al. 1997, Abb. 5.1.). Die geschilderten Vorgänge wurden an nichtokulären Zellen studiert.

Vor kurzer Zeit wurde entdeckt, daß SMAD 6 und SMAD 7 als Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion wirken. Sowohl durch TGF- β als auch durch andere Stimuli wird die Transkription inhibierender SMAD-mRNA induziert (Nakao et al. 1997). Möglicherweise agieren inhibitorische SMADs als autoregulatorische negativ-Feedback-Signale in der Signaltransduktion der TGF- β s (Heldin et al. 1997).

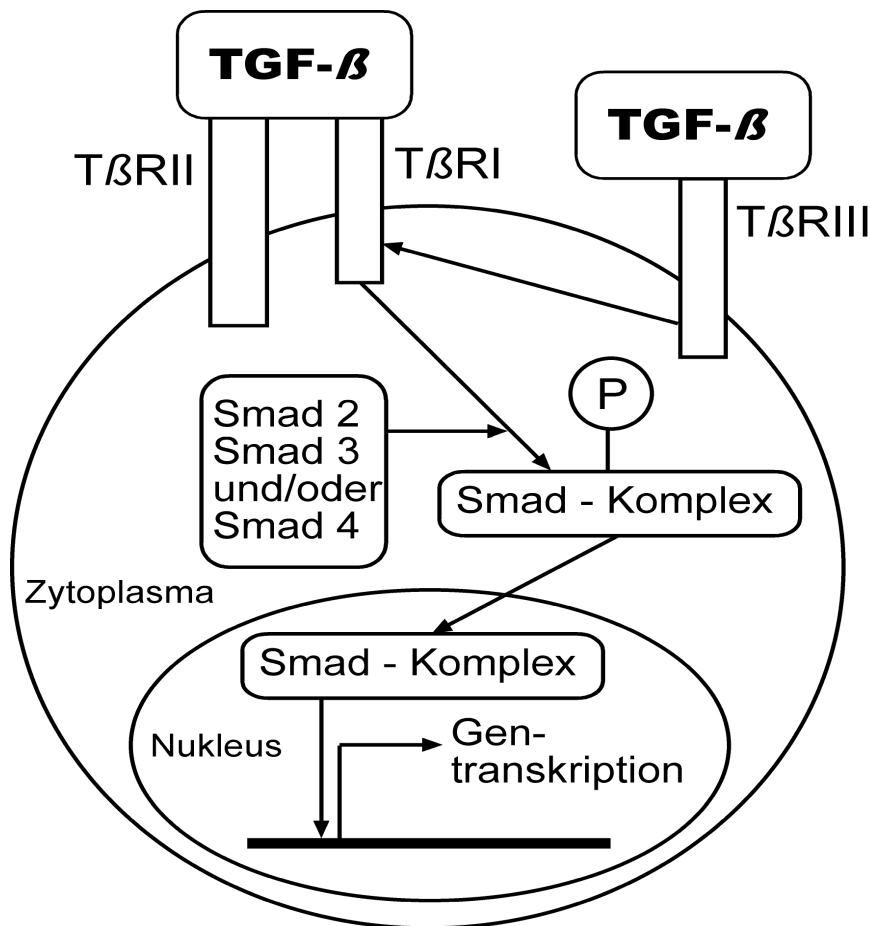


Abb. 5.1: Signaltransduktion durch TGF- β (modifiziert aus Usui et al. 1998)

Joyce und Zieske konnten nachweisen, daß humane korneale Endothelzellen die drei TGF- β -Rezeptoren I, II und III besitzen (Joyce und Zieske 1997). Nach einer Studie von Usui et al. fehlt kultivierten bovinen kornealen Endothelzellen der Rezeptor Typ III (Usui et al. 1998). Aufgrund dieser Tatsache bleibt unklar, durch welche Mechanismen die in der vorliegenden Arbeit durch TGF- β 2 ausgelösten Wirkungen auf die BCEC zustande

kommen. Eine erklärende Hypothese wäre, daß die Bindungsaffinität von TGF- β 2 an den Rezeptor Typ II für die Signaltransduktion ausreichend ist.

Jampel et al. und Tripathi et al. haben mit voneinander verschiedenen Methoden die Konzentration von TGF- β 2 in humanem Kammerwasser bestimmt. Das Kammerwasser wurde dabei in beiden Studien von Patienten entnommen, bei denen eine Routine - Kataraktoperation durchgeführt wurde. Bei Jampel et al. beträgt die TGF- β 2-Konzentration ca. 3 ng/ml und TGF- β 2 liegt zu ca. 60 % in der aktiven Form vor (Jampel et al. 1993). Die von Tripathi et al. gemessenen TGF- β 2-Konzentrationen betragen ca. 1,5 ng/ml und ca. 12 % liegen in der aktiven Form vor (Tripathi et al. 1994). Im Plasma ist TGF- β 2 nicht nachweisbar (Cheifetz et al. 1987). Somit kann ausgeschlossen werden, daß der hohe TGF- β 2 - Gehalt durch Diffusion aus dem Plasma zustande kommt. Vielmehr konnte in zahlreichen okulären Geweben die Fähigkeit zur Sekretion von TGF- β 2 nachgewiesen werden. Dazu zählen u.a. die Linse (Allen et al. 1998), die Iris (Knisely et al. 1991) und das Ziliarkörperepithel (Heibig et al. 1991; Pasquale et al. 1993). Sie sezernieren TGF- β 2 in der inaktiven oder latenten Form, in der zwei zusätzliche Polypeptidketten nichtkovalent mit dem dimerischen Molekül verbunden sind (Wakefield et al. 1988). Der physiologische Mechanismus der Aktivierung von latentem TGF- β ist nicht bekannt. In *in vitro* - Studien konnte gezeigt werden, daß Serinproteasen wie z.B. Plasmin oder Kathepsin D latenten TGF- β aktivieren können (Lyons et al. 1988).

Bei vielen Erkrankungen des Auges wurde ein erhöhter TGF- β 2 - Gehalt im Kammerwasser gefunden. Dies zeigte sich bei entzündlichen Prozessen, wie einer experimentell induzierten Uveitis (Rocha et al. 1993), oder einer endotoxininduzierten okulären Entzündung (Allen et al. 1996). Desweiteren konnte ein signifikant erhöhter Kammerwassergehalt an TGF- β 2 in Glaukom - und Kataraktaugen nachgewiesen werden (Tripathi et al. 1994, Allen et al. 1998). Welche Rolle TGF- β 2 bei diesen Erkrankungen spielt, ist unklar.

Die gegensätzlichen Wirkungen von TGF- β 2 in der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die Multifunktionalität dieses Wachstumsfaktors.

5.3 Ascorbinsäure

Bei der Beeinflussung der Proliferation und Migration boviner kornealer Endothelzellen in Zellkultur durch Ascorbinsäure wurde ebenfalls ein gegensätzlicher Effekt festgestellt. Das bedeutet, daß die Proliferation durch Ascorbinsäure gehemmt wurde, wohingegen Ascorbinsäure auf die Migration der Endothelzellen einen stimulierenden Einfluß hatte.

In einer Studie von Bode et al. wurde untersucht, welche Form des Vitamin C bevorzugt von kornealen Endothelzellen an ihrer Rückseite aufgenommen wird. Man kam zu dem Ergebnis, daß die oxidierte Form, also Dehydroascorbinsäure das bevorzugte Substrat für die Aufnahme in die kornealen Endothelzellen ist. Diese Untersuchungen wurden an bovinen kornealen Endothelzellen durchgeführt (Bode et al. 1991).

Es ist bewiesen, daß Zellen, die Substrate nicht durch einen aktiven Transport konzentrieren, Dehydroascorbinsäure bevorzugen, wohingegen Gewebe, die Substrate durch einen Na^+ - abhängigen Transport konzentrieren, Ascorbinsäure bevorzugt aufnehmen (Rose 1988, Socci und Delamere 1988). Zu den erstgenannten zählen Leukozyten und Erythrozyten (Bigley et al. 1983), zu den letztgenannten Ileum (Mellors et al. 1977), Niere (Rose 1989) und Retina (Heath und Fiddick 1966). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die von den kornealen Endothelzellen aufgenommene Dehydroascorbinsäure intrazellulär zu Ascorbinsäure reduziert wird (Bode et al. 1991). Dies läßt vermuten, daß das so entstandene Regenerationssystem der Dehydroascorbinsäure als Schutz vor derselben aufzufassen ist, da sie einen nachweislich toxischen Effekt hat, der stärker ausgeprägt ist als bei der reduzierten Form des Vitamin C (Rose et al. 1992, Bianchi et al. 1986).

Die Konzentration von Ascorbinsäure in humanem Kammerwasser liegt um ein Vielfaches (ca. 20 - fach) höher als die Plasmakonzentration (Müller und Buschke 1934, Bernadinis et al. 1965). Ähnlich hohe Ascorbinsäurekonzentrationen des Kammerwassers wurden auch bei anderen Spezies gefunden, die überwiegend am Tage wach sind, z.B. Rind und Kaninchen. Bei nachtaktiven Spezies, wie z.B. Ratte, Katze oder Eule ergaben sich bei der Untersuchung der Ascorbinsäure im Kammerwasser Konzentrationen in der Größenordnung der Plasmakonzentration (Ringvold 1980). Es liegt also nahe, daß eine hohe Ascorbinsäurekonzentration im Kammerwasser etwas mit dem einfallenden Licht zu tun hat (s.u.).

Wie kommt es nun zu dieser hohen Konzentrierung? Der Ort der Kammerwassersekretion ist das Ziliarkörperepithel mit dem pigmentierten Epithel auf der Stromaseite und dem nichtpigmentierten Epithel auf der Kammerwasserseite (Zadunaisky 1978). Helbig et al. untersuchten, über welche Mechanismen Vitamin C vom Ziliarkörperepithel transportiert wird und fanden zwei verschiedene Transportsysteme für die intrazelluläre Akkumulation der Ascorbinsäure. Zum einen existiert ein Natrium - abhängiger Ascorbinsäure - Transport, der eine Stöchiometrie von 2 Na^+ zu 1 AS (Ascorbinsäure) besitzt und zum anderen ein Natrium - unabhängiger Transport von Dehydroascorbinsäure mit intrazellulärer Dehydroascorbinsäure - Reduktase. Anschließend kann die intrazellulär akkumulierte Ascorbinsäure ohne Energieverbrauch entlang des elektrochemischen Gradienten oder durch Kopplung an andere Ionen vom Ziliarkörperepithel ins Kammerwasser gelangen (Abb. 5.2. und 5.3.). Diese Ergebnisse basieren auf Untersuchungen an bovinen Ziliarkörperepithelzellen (Helbig et al. 1990).

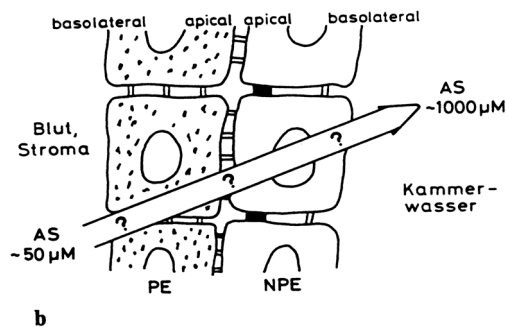


Abb. 5.2: Ziliarkörperepithel mit pigmentierter (PE) und nichtpigmentierter (NPE) Epithelschicht (aus Helbig et al. 1990)

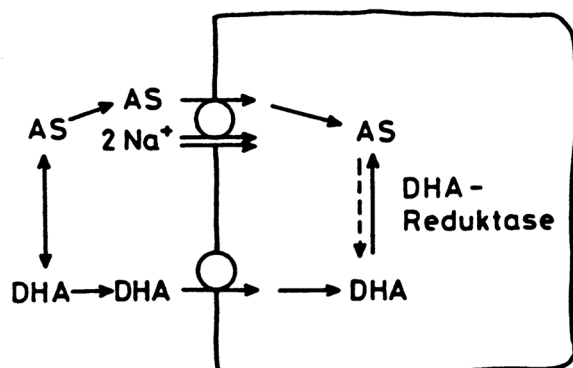


Abb. 5.3: Modell für die intrazelluläre Akkumulation von Ascorbinsäure (AS) in PE-Zellen (aus Helbig et al. 1990)

Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß Ascorbinsäure einen hemmenden Einfluß auf die Zellproliferation nimmt. So konnte die antiproliferative bzw. zytotoxische Wirkung von Ascorbinsäure auf Linsenepithelzellen (Wunderlich et al. 1992), Hornhautepithelzellen (Knorr et al. 1996), Fibroblasten (Jampel 1990) sowie Ehrlich - Aszites - Tumorzellen (Benade et al. 1964) nachgewiesen werden. Die zytotoxische Wirkung von Ascorbinsäure ist zelldichteabhängig. Dies konnte für Linsenepithelzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden (Jampel 1990, Wunderlich et al. 1992) und zeigt, daß Zellen, die im Zellverband vorliegen, eine höhere Toleranz gegenüber Ascorbinsäure aufweisen. In den durchgeführten Experimenten zur Untersuchung der Migration liegt ein konfluenter Zellrasen vor, in den eine kreisrunde „Wunde“ gesetzt wurde. Die im Wundinneren abgetöteten Zellen wurden vor der Inkubation mit Ascorbinsäure gründlich abgespült, so daß nur Zellen im geschlossenen Zellverband der Ascorbinsäure ausgesetzt waren.

Ich möchte etwas näher auf die bereits vorliegenden Ergebnisse zur Wirkung von Ascorbinsäure auf korneale Endothelzellen anderer Tierspezies und auch auf bovine korneale Endothelzellen eingehen. Die Arbeitsgruppe Yue et al. konnte einen schädigenden Einfluß von Ascorbinsäure auf das Wachstum von kornealen Kaninchenendothelzellen in Zellkultur beschreiben (Yue et al. 1980). Dabei wurden die gewonnenen Endothelzellen mit Medium inkubiert, das Ascorbinsäure in einer Konzentration von 75 µg/ml enthielt. Die Ergebnisse zeigten, daß die mit Ascorbinsäure inkubierten Kulturen einen längeren Zeitraum benötigten, um konfluent zu wachsen und bei Konfluenz eine geringere Zellzahl aufwiesen, als die der Kontrollzellkulturen. Es wird von einem zytotoxischen Effekt gesprochen, der jedoch nicht belegt ist. In unseren Versuchen wurden Vitalitätsprüfungen durchgeführt, die belegen, daß Ascorbinsäure in den untersuchten Konzentrationen keinen toxischen Einfluß auf kultivierte bovine korneale Endothelzellen hat, sondern das eine direkte Hemmung der Zellproliferation erfolgt.

Es liegen Studien vor, die einen fördernden Effekt von Ascorbinsäure auf die Zellteilung pflanzlicher Zellen beschrieben. Dabei wurden Zelllinien der Wurzeln von *Allium cepa* und *Vicia faba* benutzt (Liso et al. 1984). Ein stimulierender Einfluß von Ascorbinsäure auf tierische Zellen wurde bisher nicht gezeigt.

Der Einfluß von Ascorbinsäure speziell auf die Migration wurde bisher weder für okuläre Zellen noch für andere Zelllinien untersucht. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit, die

einen fördernden Einfluß von Ascorbinsäure auf die Migration der BCEC zeigen, läßt sich aber schlußfolgern, daß tatsächlich keine Zytotoxizität der Ascorbinsäure vorliegt.

Der hohe Gehalt des Kammerwassers an der „Gesamt“-Ascorbinsäure kann am besten durch ihre biochemischen Funktionen, die sie am Auge übernimmt, erklärt werden. So ist sie wahrscheinlich ein Schutzmechanismus für intraokulare Gewebe vor lichtinduzierten Schäden, da sie eine der wichtigsten UV-Licht absorbierenden Komponenten des Kammerwassers ist und außerdem als Redoxsystem lichtinduzierte Radikale unschädlich machen kann. Ascorbinsäure reagiert mit den durch Strahlung entstehenden Superoxidanionen und Hydroxylradikalen.

Desweiteren wurde die Vermutung aufgestellt, daß das Kammerwasser als ein UV-Filter zum Schutz der hinter ihm liegenden Strukturen dient. Es konnte nachgewiesen werden, daß die im Kammerwasser vorhandene Ascorbinsäure die Absorption und die Wellenlänge der Strahlung herabsetzt (Ringvold 1996; Ringvold 1980; Reiss et al. 1986). Nachweislich reduziert der hohe Ascorbinsäuregehalt im Kammerwasser die durch UV- A und UV- B induzierten DNA - Schäden des Linsenepithels (Lin et al. 1994). Auch für den Schutz vor den innerhalb der Atmungskette und bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser entstehenden Radikalen sowie vor H_2O_2 , das bei metabolischen Reaktionen entsteht, scheint der hohe Ascorbinsäuregehalt eine entscheidende Rolle zu spielen (Rose et al. 1998).

Nachdem in der vorliegenden Arbeit der hemmende Einfluß von Ascorbinsäure auf die Proliferation der BCEC nachgewiesen wurde, folgte die Durchführung von Versuchen mit 12-S-HETE. Dabei konnte die hemmende Wirkung von Ascorbinsäure bei einer Konzentration von 50µg/ml durch Zugabe von 12-S-HETE in der Konzentration 0,1 µM partiell wieder aufgehoben werden. Diese interessante Beobachtung zeigt den weitreichenden Einfluß von Ascorbinsäure auch auf den Lipoxxygenaseweg des Arachidonsäuremetabolismus und korreliert mit den Beobachtungen von Willams et al., Chan et al. und Gupta et al.. Ascorbinsäure hemmt die Bildung von 12-S-HETE durch korneale Zellen (Willams et al 1986). 12-S-HETE begünstigt die Proliferation epidermaler Zellen (Chan et al. 1985). Eine Hemmung der Lipoxxygenase, welche die Entstehung von 12-S-HETE bewirkt, hat eine Verzögerung der Wundheilung kornealer Rattenepithelzellen zur Folge (Gupta et al. 1992).

Zusammenfassend soll diese Arbeit zur Aufklärung beitragen, welche Rolle das Kammerwasser selbst, sowie Faktoren, die in hoher Konzentration im Kammerwasser vorhanden sind, im Wundheilungsprozess kornealer Endothelzellen spielen.

Die durchgeführten Experimente beziehen sich ausschließlich auf bovine korneale Endothelzellen in Zellkultur. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Ergebnisse auch für humane korneale Endothelzellen gelten.

6 Zusammenfassung

Korneale Endothelzellen sind *in vivo* ständig in Kontakt mit Kammerwasser, welches die Kornearückfläche umspült. Der Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor- β 2 (TGF- β 2) und Ascorbinsäure sind in hoher Konzentration im Kammerwasser enthalten. Der Einfluß von humanem Kammerwasser selbst, sowie von TGF- β 2 und Ascorbinsäure, auf die Proliferation und Migration boviner kornealer Endothelzellen wurde *in vitro* untersucht.

Bovine korneale Endothelzellen wurden gezüchtet und die Zellen der ersten Passage für die Experimente verwendet. Zur Untersuchung der Proliferation und Migration kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung:

1. Proliferationsassay: 12 Stunden nach Aussaat einer definierten Zellzahl wurden verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (Kammerwasser, TGF- β 2 und Ascorbinsäure) zu den Zellen gegeben und 3 bzw. 4 Tage inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der Zellen.
2. Migrationsassay: In einen konfluenten Zellrasen wurde mit einem modifizierten Trepan (\varnothing 5,5 mm) eine „Wunde“ gesetzt. So entstand eine zirkuläre, zellfreie Wundfläche. Der Wundrand blieb über die gesamte Dauer des Versuches sichtbar. Anschließend wurden die Zellkulturen gewaschen und Kammerwasser, TGF- β 2 oder Ascorbinsäure appliziert. Die Inkubationszeit betrug 3 bzw. 4 Tage. Nach Fixierung und Anfärbung der Zellkulturen erfolgte die Auswertung durch Auszählung der über den Wundrand migrierten Zellen.

Ergänzend wurden Vitalitätsprüfungen durchgeführt und die Ergebnisse photodokumentiert.

Ergebnisse:

Die Proliferation der kornealen Endothelzellen wurde durch humanes Kammerwasser und Ascorbinsäure gehemmt. Unverdünntes Kammerwasser inhibierte die Proliferation nahezu vollständig, mit 10%igem Kammerwasser wurde eine Proliferationsrate von 70% der Kontrollzellkulturen beobachtet. Bei einer Ascorbinsäurekonzentration von 200 μ g/ml war die Hemmung am stärksten ausgeprägt (ca. 90%). Eine partielle Aufhebung

der hemmenden Wirkung der Ascorbinsäure konnte durch gleichzeitige Inkubation mit 12-S-Hydroxyeicosatetraenoicssäure beobachtet werden.

TGF- β 2 stimulierte die Proliferation der Zellen bis zu einem dreifachen Wert der Kontrollen.

Die Migration wurde durch humanes Kammerwasser und TGF- β 2 gehemmt. Die Hemmung betrug nahezu 100 % für unverdünntes Kammerwasser und 30 % für 10%iges Kammerwasser. Die Migrationsrate wurde bei allen TGF- β 2-Konzentrationen auf ca. 50 % reduziert. Ascorbinsäure hatte einen stimulierenden Einfluß (20-50 %) auf die Migration.

Toxische Effekte von Ascorbinsäure oder TGF- β 2 auf die Proliferation und Migration wurden nicht beobachtet.

Es ist noch unklar, welche Substanzen im Kammerwasser für den hemmenden Einfluß verantwortlich sind. Weiterhin muß die Wirkung von Kammerwasser auf den Wundheilungsprozess kornealer Endothelzellen *in vivo* geklärt werden.

Sowohl Ascorbinsäure als auch TGF- β 2 zeigten einen gegensätzlichen Effekt auf Migration und Proliferation kultivierter boviner kornealer Endothelzellen. Welche Bedeutung diese Beobachtungen für die Wundheilung humaner kornealer Endothelzellen *in vivo* haben, bleibt noch zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

1. Allen J.B., McGahan M.C., Ogawa Y., Sellon D.C., Clark B.D. und Fleisher L.N. (1996): Intravitreal transforming growth factor- β 2 decreases cellular infiltration in endotoxin-induced ocular inflammation in rabbits. *Curr Eye Res* 15: 95-103
2. Allen J.B., Davidson M.G., Nasisse M.P., Fleisher L.N. und McGahan M.C. (1998): The lens influences aqueous humor levels of transforming growth factor- β 2. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236: 305-311
3. Assoian R.K., Komoriya A., Meyers C.A., Miller D.M. und Sporn M.B. (1983): Transforming growth factor beta in human platelets. *J Biol Chem* 258:7155-7160
4. Baird A., Böhlen P., Ling N. und Guillemin R. (1985) Radioimmunoassay for fibroblast growth factor(FGF): release by the bovine anterior pituitary in vitro. *Regul Pept* 10:309-317
5. Baird A. und Böhlen P.: Fibroblast Growth factor in Sporn M.B. und Roberts A.B.(Hrsg.): *Peptide Growth factors and their receptors*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong 1990, S. 369-418
6. Barnes D. und Sato G. (1980): Serum cell culture: an unifying approach. *Cell* 22: 649
7. Benade L., Howard T. und Burk D. (1964): Synergistic killing of Ehrlich ascitis carcinoma cells by ascorbate and 3-amino-1,2,4-triazole. *Oncology* 23: 33-43
8. Bernadinis E., Tieri O., Polzella A. und Iuglio N. (1965): The chemical composition of the human aqueous humor in normal and pathological conditions. *Exp Eye Res* 4: 179-186
9. Bianchi J und Rose R.C. (1986): Dehydroascorbic acid and cell membranes: Possible disruptive effects. *Toxicology* 40: 75
10. Bigley R., Wirth M., Layman D., Riddle M. und Stankova L. (1983): Interaction between glucose and dehydroascorbate transport in human neutrophils and fibroblasts. *Diabetes* 32: 545
11. Bode A.M., Vanderpool S.S., Carlson E.C., Meyer D.A. und Rose R.C. (1991): Ascorbic acid uptake and metabolism by corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2266-2271
12. Bradshaw R.A. und Cavanaugh K.P.: Isolation and Characterization of Growth Factors, in Roberts A.B., und Sporn M.B. (Hrsg.): *Peptide Growth Factors and their Receptors I*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong 1990, S.17-36
13. Burke J., Foster S. und Herschler J. (1982/83): Aqueous humor as a modulator of growth in fibroblast cultures. *Curr Eye Res* 2: 835-841
14. Capella J.A. (1972): Regeneration of endothelium in diseased and injured corneas. *Am J Ophthalmol* 74: 811-817
15. Chan C.C., Duhamel L. und Ford-Hutchinson A. (1985): Leukotriene B4 and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulate epidermal proliferation in vivo in the guinea pig. *J Invest Dermatol* 85: 333-334
16. Cheifetz S., Weatherbee J.A. und Tsang M.L.S. (1987): The Transforming growth factor β -system, a complex pattern of crossreactive ligands and receptors. *Cell* 48: 409-415
17. Cohen S. (1962): Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 237:1555-1562
18. Coulter J.B., Engelke J.A. und Eaton D.K. (1980): Insulin concentrations in aqueous humor after paracentesis and feeding of rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1524

19. de Martin R., Haendler B., Hofer-Warbinek R., Gaugitsch H., Wrann M., Schlusener H., Seifert J.M., Bodmer S., Fontana A. und Hofer E. (1987): Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor beta gene family. *EMBO J* 6:3673-3677
20. Derynck R., Jarrett J.A., Chen E.Y., Eaton D.H., Bell J.R., Assoian R.K., Roberts A.B., Sporn M.B. und Goeddel D.V. (1985): Human Transforming growth factor beta cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature* 316:701-705
21. Derynck R., Lindquist P.B., Lee A., Wen D., Tamm J., Graycar J.L., Rhee L., Mason A.J., Miller D.A., Coffey R.J., Moses H.L. und Chen E.Y. (1988): A new type of transforming growth factor β , TGF- β 3. *EMBO J* 7:3737-3743
22. Derynck R. (1996): Nomenclature: vertebrate mediators of TGF β family signals. *Cell* 87: 173
23. Eakins K.E., Whitelocke R.A.F., Perkins E.S., Bennet A. und Unger W.G. (1972): Release of prostaglandins in ocular inflammation in the rabbit. *Nature (New Biol)* 239: 248
24. Esch F., Baird A., Ling N., Ueno N., Hill F., Denoroy L., Klepper R., Gospodarowicz D., Böhlen P. und Guillemin R. (1985): Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6507-6511
25. Friedrich W. : Handbuch der Vitamine. München, Wien, Baltimore 1987
26. Geroski D.H. und Edelhauser H.F. : Functional response to wounding in the corneal endothelium. in Beuerman R.W., Crosson C.E., Kaufman H.E. (Hrsg.): Healing processes in the cornea, 1989, S. 111-125
27. Gospodarowicz D., Meschner A. und Birdwell C.R. (1977): Stimulation of corneal endothelial cell proliferation in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp. Eye Res* 25:75-89
28. Granstein R.D., Staszewski R., Knisely T.L., Zeira E., Nazareno R., Latina M. und Albert D.M. (1990): Aqueous humor contains Transforming Growth Factor- β and a small(<3500 Daltons) inhibitor of thymocyte proliferation. *J Immunol* 144: 3021-3027
29. Gregory H. (1975): Isolation and Structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor, *Nature* 257:325-327
30. Grehn F. und Leydecker W. : Erkrankungen der Hornhaut. in Grehn F. und Leydecker W. : Augenheilkunde, Berlin, Heidelberg, New York 1995, S. 77-107
31. Gupta A.G., Hirakata A. und Proia A.D. (1993): Effect of Inhibitors of Arachidonic Acid Metabolism on Corneal Reepithelialization in the Rat. *Exp Eye Res* 56: 701-708
32. Hartmann Ch., Kilp H. und Kolp M. (1986): Die Regeneration des menschlichen Hornhautendothels nach direktem Nd:YAG-Lasertrauma. *Fortschr Ophthalmol* 83:448-452
33. Heath H. und Fiddick R. (1966): The active transport of ascorbic acid by the rat retina. *Exp Eye Res* 5: 156
34. Heimark R.L., Twardzik D.R. und Schwartz S.M. (1986): Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science* 233: 1078-1080
35. Helbig H., Korbmacher C. und Wiederholt M. (1990): Mechanismen des Transportes von Ascorbinsäure in das Kammerwasser. *Fortschr Ophthalmol* 87: 421-424
36. Helbig H., Kittredge K.L., Coca-Prados M., Davis J., Palestine A.G. und Nussenblatt R.B. (1991): Mammalian ciliary-body epithelial cells in culture produce transforming growth factor-beta. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 229: 84-87

37. Heldin C.H., Miyazono K. und ten Dijke P. (1997): TGF- β signalling from membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471
38. Hurst J.S., Balazy M., Bazan H.E.P. und Bazan N.G. (1991): The epithelium, endothelium and stroma of the rabbit cornea generate 12-S-HETE as the main Lipoxygenase metabolite in response to injury. *J Biol Chem* 266: 6726-6730
39. Jampel H.D., Roche N., Stark W.J. und Roberts A.B. (1990): Transforming growth factor - β in human aqueous humor. *Curr Eye Res* 9: 963-969
40. Jampel H.D. (1990): Ascorbic acid is cytotoxic to dividing human Tenon's capsule fibroblasts. *Arch Ophthalmol* 108. 1323-1325
41. Joyce N.C. und Zieske J.D. (1997): Transforming growth factor- β receptor expression in human cornea. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 38:1922-1928
42. Kaiser C.J., Ksander B.R. und Streilein J.W. (1989): Inhibition of lymphocyte proliferation by aqueous humor. *Reg Immunol* 2: 42-49
43. Kaufman H.E., Barron B.A., McDonald M.B. und Waltman S.R. : The cornea. New York 1988
44. Kay E., Lee M., Seong G. und Lee Y.G. (1998): TGF- β s stimulate cell proliferation via an autocrine production of FGF-2 in corneal stromal fibroblasts. *Curr Eye Res* 17: 286-293
45. Knisely T.L., Bleicher P.A., Vibbard C.A. und Granstein R.D. (1991): Production of latent transforming growth factor-beta and other inhibitory factors by cultured iris and ciliary body cells. *Curr Eye Res* 10: 761-771
46. Knorr M., Wunderlich K., Steuhl K.P. und Thiel H.J. (1996): Wirkung von Heparin und Ascorbinsäure auf das Wachstumsverhalten kultivierter Hornhautepithelzellen des Kaninchens. *Der Ophthalmologe* 93:275-278
47. Kurosaka D. und Nagamoto T. (1994): Inhibitory effect of TGF- β 2 in human aqueous humor on bovine lens epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3408-3412
48. Ledbetter S.R., Hatchell D.L. und O'Brien W.J. (1983): Secondary aqueous humor stimulates the proliferation of cultured bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 557-562
49. Lin H.Y., Wang X.F., Ng-Eaton E., Weinberg R.A. und Lodish H.F. (1992): Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell (Cambridge, Mass.)* 68:775-785
50. Lin L-R. Chakrapani B., Giblin F.J. und Reddy V.N. (1994): The effect of aqueous humor ascorbate on UV-B-induced DNA damage in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, (Suppl.), 2134
51. Liso R., Calabrese G., Bitonti M.B. und Arrigoni O. (1984): Relationship between ascorbic acid and cell division. *Exp Cell Res* 150:314-320
52. Lobb R.R. und Fett J.W. (1984): Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry* 24:6295-6299
53. Lopez-Casillas F., Cheifetz S., Doody J., Andres J.L., Lane W.S. und Massague' J. (1991): Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell (Cambridge, Mass.)* 67:785-795
54. Lopez-Casillas R., Wrana J.L. und Massague' J. (1993):, Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell* 73:1435-1444

55. Lopez J.G., Hagenah M. und Insler : Growth factors and corneal endothelial wound healing. in Beuerman R.W., Crosson C.E. und Kaufman H. E. (Hrsg.): Healing processes in the cornea, 1989, S. 139-150
56. Lyons R.M., Keski-Oja J. und Moses H.L. (1988): Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. J Cell Biol. 106: 1659-1665
57. Matsui J. (1929): Über die in-vitro Kultur des Endothels de Membrana Descemeti. Arch f exp Zellf 8:534-546
58. Mellors A.J., Nahrwold D.L. und Rose R.C. (1977): Ascorbic acid flux across the mucosal border of guinea pig and human ileum. Am J Physiol 233: 347
59. Miyazono K., ten Dijke P., Ichijo H. und Heldin C.H. (1993): Receptors for Transforming growth factor β . Advances in Immunology 55:181-220
60. Müller H.K. und Buschke W. (1934): Vitamin in Linse, Kammerwasser und Blut bei normalem und pathologischem Linsenstoffwechsel. Arch Augenheilkd 108: 368-390
61. Nakao A., Imamura T., Souchelnytskyi S., Kawabata M., Ishisaki A., Oeda E., Tamaki K., Hanai J., Heldin C.H., Miyazono K. und ten Dijke P. (1997): TGF- β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. EMBO J 16: 5353-5362
62. Needleman P., Turk J., Jakschik B.A., Morrison A.R. und Lefkowitz J.B. (1986): Arachidonic acid metabolism. Ann Rev Biochem 55: 69-102
63. Nobile S. und Woodhill J.M. : Vitamin C- The mysterious Redox-system-A Trigger of life?. Boston 1981
64. Pasquale L.R., Dorman-Pease M.E., Luty G.A., Quigley H.A. und Jampel H.D. (1993): Immunolocalization of TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 in the anterior segment of the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 23-30
65. Raymand G.M., Jumblatt M.M., Bartels S.P. und Neufeld A.H. (1986): Rabbit corneal endothelial cells in vitro. Effects of EGF. Invest Ophthalmol Vis Sci 27:474-479
66. Reddan J.R., Weinsieder A. und Wilson D. (1979): Aqueous humor from traumatized eyes triggers cell division in the epithelia of cultured lenses. Exp Eye Res 28: 267
67. Reddan J.R. und Wilson-Dziedzic D. (1983): Insulin growth factor and epidermal growth factor trigger mitosis in lenses cultured in a serum-free medium. Invest Ophthalmol Vis Sci 24:409-416
68. Reiss G.R., Warness P.G., Zollmann P.E. und Brubaker R.F. (1986): Ascorbic acid levels in the aqueous humor of nocturnal and diurnal mammals. Arch Ophthalmol 104: 753-755
69. Rieck P., Hartmann C., Jacob C., Pouliquen Y. und Courtois Y. (1992): Human recombinant bFGF stimulates corneal endothelial wound healing in rabbits. Curr Eye Res 11:1161-1172
70. Rieck P., Oliver L., Engelmann K., Fuhrmann G., Hartmann C und Courtois Y. (1995): The role of exogenous/endogenous Basic Fibroblast Growth Factor (FGF2) and Transforming Growth Factor β (TGF- β 1) on human corneal endothelial cells proliferation in vitro. Exp Cell Res 220: 36-46
71. Ringvold A. (1980): Aqueous humor and ultraviolet radiation. Acta Ophthalmol 58: 69-82
72. Ringvold A. (1996): The significance of ascorbate in the aqueous humor protection against UV-A and UV-B. Exp Eye Res 62: 261-264
73. Rocha G., Baines M.G., Deschenes J., Duclos A.J. und Anteck E. (1993): Transforming growth factor- β levels in aqueous humor during experimentally induced uveitis. Ocular Immunol Inflamm 1: 343-354

74. Rose R.C. (1988): Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins. *Biochem Biophys Acta* 947: 335
75. Rose R.C. (1989): Renal metabolism of the oxidized form of ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid). *Am J Physiol* 256: 52
76. Rose R.C., Choi J.L. und Bode A.M. (1992): Short term effects of oxidized ascorbic acid on bovine corneal endothelium and human placenta. *Life Sci* 50: 1543-1549
77. Sankar S., Mahooti-Brooks N., Centrella M., McCarthy T.L. und Madri J.A. (1995): Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor β 2. *J Biol Chem* 270: 13567-13572
78. Savage C., Das P., Finelli A.L., Townsend S.R., Sun C.Y., Baird S.E. und Padgett R.W. (1996): *Caenorhabditis elegans* genes *sma2*, *sma3* and *sma 4* define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 790-794
79. Schimmelpfennig B.H. (1982): Inhomogene Verteilung des menschlichen Korneaendothels. *Klin Mbl Augenheilk* 180: 350-351
80. Sekelsky J.J., Newfeld S.J., Raftery L.A., Chartoff E.H. und Gelbart W.M. (1995): Genetic characterization and cloning of Mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139: 1347-1358
81. Shinoda I., Tokida N., Kurobe M., Furukawa S. und Hayashi K. (1988): Demonstration of a considerable amount of mouse epidermal growth factor in aqueous humor. *Biochem Int* 17:243-248
82. Socci R.R. und Declamere N.A. (1988): Characteristics of ascorbate transport in the rabbit iris-ciliary body. *Exp Eye Res* 46: 853
83. Souchelnytskyi S., ten Dijke P., Miyazono K. und Heldin C.H. (1996): Phosphorylation of Ser 165 in TGF- β type I receptor modulates TGF- β 1 induced cellular response. *EMBO J* 15: 6231-6240
84. Sporn M.B. und Roberts A.B.: The multifunctional nature of peptide growth factors, in Sporn M.B. und Roberts A.B.(Hrsg.): *Peptide growth factors and their receptors I*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong 1990, S.3-15
85. Taylor M.J. (1986): Clinical cryobiology of tissue preservations of corneas. *Cryobiology* 23: 323
86. ten Dijke P., Hanson P., Iwata K.K., Pieler C. und Foulkes J.G. (1988): Identification of a new member of the transforming growth factor β gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4715-4719
87. Thomas K.A., Rios-Cadelore M. und Fitzpatrick S. (1984): Purification and characterization of acidic fibroblast Growth factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:357-361
88. Treffers W.F. (1982): Human corneal endothelial wound repair. *Ophthalmology* 89:605-613
89. Tripathi R.C., Li J., Chan W.F. und Tripathi B.J. (1994): Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF- β 2. *Exp Eye Res* 59: 723-728
90. Usui T., Takase M., Kaji Y., Suzuki K., Ishida K., Tsuru T., Miyata K., Kawabata M. und Yamashita H. (1998): Extracellular matrix production regulation by TGF- β in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 1981-1989
91. Wang X.F., Lin H.Y., Ng-Eaton E., Downward J., Lodish H.F. und Weinberg R.A. (1991): Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell (Cambridge, Mass.)* 67:797-805

92. Waring G.O., Bourne W.M., Edelhauser H.F. und Kenyon K.R. (1982): The corneal endothelium: normal and pathologic structure and function. *Ophthalmol* 89(6): 531-590
93. Waring G.O. (1992): Refractive keratotomy for myopia and astigmatism. St. Louis MO (USA)
94. Watanabe K., Nakagawa S. und Nishida T. (1987): Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:205-211
95. Weinsieder A., Briggs R., Reddan J., Rothstein H., Wilson D. und Harding C.V. (1975): Induction of mitosis in ocular tissue by chemotoxic agents. *Exp Eye Res* 20: 33
96. Willams R.N. und Paterson C. (1986): Modulation of Corneal Lipoxygenase by Ascorbic Acid. *Exp Eye Res* 43: 7-13
97. Wilson S.E., Schultz G.S., Chegini N., Wenig J. und He Y. (1994): Epidermal Growth factor, Transforming growth factor alpha, Transforming growth factor beta, Acidic fibroblast growth factor, Basic fibroblast growth factor and Interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res* 59:63-72
98. Wrana J.L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. und Maasagué J. (1994): Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 370: 341-347
99. Wunderlich K., Knorr M., Dartsch P.C., Steuhl K.P. und Thiel H.J. (1992): Die Ascorbinsäure-Zytotoxischer Effekt auf kultivierte bovine Linsenepithelzellen. *Ophthalmologe* 89: 313-318
100. Yamashita H., ten Dijke P., Franzén P., Miyazono K. und Heldin C.H. (1994): Formation of heterooligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor β . *J Biol Chem* 269: 20172-20178
101. Yue B.Y.J.T., Niedra R. und Baum J.L. (1980): Effects of ascorbic acid on cultured rabbit corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12: 1471-1476
102. Zadunaisky J.A.: Transport in eye epithelia: ciliary body and retina pigment epithelium. in Giebisch G, Tosteson D.C. und Ussing H.H. (Hrsg.): *Membrane transport in biology*, Berlin, Heidelberg, New York 1978, S. 337-354
103. Zagorski Z.: Replication capacity of the regenerating human corneal endothelium in organ culture. in Naumann G.O.H. und Gloor B.P. (Hrsg.): *Wundheilung des Auges und ihre Komplikationen*, München 1980,

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ilona Ryseck
Geburtsdatum/-ort	21. August 1974, Berlin
Eltern	Dr. Hans-Eckhard Ryseck, Physiker Marieluise Ryseck, Landschaftsarchitektin
Nationalität	deutsch

Ausbildung

1981 - 1983	POS Zeuthen
1983 - 1990	POS „Heinrich Rau“ mit erweitertem Sprachunterricht, Wildau
1990 - 1993	„Friedrich Schiller“- Gymnasium, Königs Wusterhausen, Abschluß: Abitur
WS 1993 - SS 1996	Humboldt-Universität zu Berlin Studium der Medizin
8/95	Physikum
8/96	1. Staatsexamen
WS 1996 - SS 1999	Universität Kopenhagen Studium der Medizin im Rahmen des Erasmus- Programmes
ab WS 1997	Fortsetzung des Studiums an der Humboldt - Universität zu Berlin
WS 1998 - SS 1999	experimentelle Promotionsarbeit an der Augenklinik der Charité mit universitärer Forschungsförderung

9 ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Weiterhin erkläre ich, daß ich an keiner anderen Stelle ein Promotionsverfahren beantragt habe.

Berlin, den 23. November 1999

Ilona Ryseck

10 Vorabveröffentlichungen

Ryseck I., Hartmann Ch., Rieck P.: Differential effect of TGF- β 2 on proliferation and migration of bovine corneal endothelial cells in *vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl.) 40/4:627 (1999)

Ryseck I., Hartmann Ch., Rieck P.: The effect of human aqueous humor, TGF- β 2 and ascorbic acid on proliferation of bovine corneal endothelial cells in *vitro*. Ophthalmic Res (Suppl.) 31:1 (1999)